

Peter Baierl

MESSUNG DER DIFFUSION
VON KALIUM-, LITHIUM- UND TMA-IONEN
IM CEREBELLAREN CORTEX
MIT HILFE VON IONENSELEKTIVEN
MIKROELEKTRODEN

Diss München
1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0053

Aus dem Physiologischen Institut I der
Universität München
Vorstand: Prof. G. ten Bruggencate

MESSUNG DER DIFFUSION VON KALIUM-, LITHIUM-
UND TMA-IONEN IM CEREBELLAREN CORTEX MIT HILFE
VON IONENSELEKTIVEN MIKROELEKTRODEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Baierl

aus Weilheim

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1983

INHALT

I. Einleitung	1
II. Die Bedeutung der Musik	2
A. Die Musik als Kunst	2
B. Die Musik als Wissenschaft	3
C. Die Musik als Lebensgestaltung	4
D. Die Musik als Erziehungsmittel	5
E. Die Musik als Heilmittel	6
F. Die Musik als Weltanschauung	7
G. Die Musik als Kultur	8
H. Die Musik als Religion	9
I. Die Musik als Philosophie	10
J. Die Musik als Politik	11
K. Die Musik als Wirtschaft	12
L. Die Musik als Recht	13
M. Die Musik als Medizin	14
N. Die Musik als Pädagogik	15
O. Die Musik als Psychologie	16
P. Die Musik als Soziologie	17
Q. Die Musik als Anthropologie	18
R. Die Musik als Kosmologie	19
S. Die Musik als Theologie	20
T. Die Musik als Ethnologie	21
U. Die Musik als Linguistik	22
V. Die Musik als Historiographie	23
W. Die Musik als Bibliographie	24
X. Die Musik als Philologie	25
Y. Die Musik als Numismatik	26
Z. Die Musik als Epigraphik	27
AA. Die Musik als Paläontologie	28
AB. Die Musik als Archäologie	29
AC. Die Musik als Ethnologie	30
AD. Die Musik als Linguistik	31
AE. Die Musik als Historiographie	32
AF. Die Musik als Bibliographie	33
AG. Die Musik als Philologie	34
AH. Die Musik als Numismatik	35
AI. Die Musik als Epigraphik	36
AJ. Die Musik als Paläontologie	37
AK. Die Musik als Archäologie	38
AL. Die Musik als Ethnologie	39
AM. Die Musik als Linguistik	40
AN. Die Musik als Historiographie	41
AO. Die Musik als Bibliographie	42
AP. Die Musik als Philologie	43
AQ. Die Musik als Numismatik	44
AR. Die Musik als Epigraphik	45
AS. Die Musik als Paläontologie	46
AT. Die Musik als Archäologie	47
AU. Die Musik als Ethnologie	48
AV. Die Musik als Linguistik	49
AW. Die Musik als Historiographie	50
AX. Die Musik als Bibliographie	51
AY. Die Musik als Philologie	52
AZ. Die Musik als Numismatik	53
BA. Die Musik als Epigraphik	54
BB. Die Musik als Paläontologie	55
BC. Die Musik als Archäologie	56
BD. Die Musik als Ethnologie	57
BE. Die Musik als Linguistik	58
BF. Die Musik als Historiographie	59
BG. Die Musik als Bibliographie	60
BH. Die Musik als Philologie	61
BI. Die Musik als Numismatik	62
BJ. Die Musik als Epigraphik	63
BK. Die Musik als Paläontologie	64
BL. Die Musik als Archäologie	65
BM. Die Musik als Ethnologie	66
BN. Die Musik als Linguistik	67
BO. Die Musik als Historiographie	68
BP. Die Musik als Bibliographie	69
BQ. Die Musik als Philologie	70
BR. Die Musik als Numismatik	71
BS. Die Musik als Epigraphik	72
BT. Die Musik als Paläontologie	73
BU. Die Musik als Archäologie	74
BV. Die Musik als Ethnologie	75
BV. Die Musik als Linguistik	76
BV. Die Musik als Historiographie	77
BV. Die Musik als Bibliographie	78
BV. Die Musik als Philologie	79
BV. Die Musik als Numismatik	80
BV. Die Musik als Epigraphik	81
BV. Die Musik als Paläontologie	82
BV. Die Musik als Archäologie	83
BV. Die Musik als Ethnologie	84
BV. Die Musik als Linguistik	85
BV. Die Musik als Historiographie	86
BV. Die Musik als Bibliographie	87
BV. Die Musik als Philologie	88
BV. Die Musik als Numismatik	89
BV. Die Musik als Epigraphik	90
BV. Die Musik als Paläontologie	91
BV. Die Musik als Archäologie	92
BV. Die Musik als Ethnologie	93
BV. Die Musik als Linguistik	94
BV. Die Musik als Historiographie	95
BV. Die Musik als Bibliographie	96
BV. Die Musik als Philologie	97
BV. Die Musik als Numismatik	98
BV. Die Musik als Epigraphik	99
BV. Die Musik als Paläontologie	100

Für Inge

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theorie der Diffusion	3
2.1. Freie Diffusion	3
2.2. Diffusion mit Oberflächenbarriere	6
2.3. Tortuosität und Volumenfraktion	8
2.4. Das Drei-Kompartiment-Modell	10
2.5. Lösung der Differentialgleichung für das Drei-Kompartiment-Modell	15
2.6. Spatial buffering	21
3. Ionenselektive Mikroelektroden (ISM)	24
3.1. Theorie der ISM	24
3.2. Aktivitäten und Konzentrationen	30
3.3. Bau der ionenselektiven Mikroelektroden	31
3.4. Messung der Ionensignale	33
3.5. Eichung der ionenselektiven Mikroelektroden	34
4. Durchführung der Messungen und Auswertung der Ergebnisse	44
4.1. Messungen im Agar	44
4.1.1. Auswertung der TMA^+ -Messungen	45
4.1.2. Auswertung der K^+ -Messungen	47
4.1.3. Auswertung der Li^+ -Messungen	49
4.1.4. Vergleich der Agar-Experimente mit Diffusionsmessungen in wäßriger Lösung	49
4.2. Messungen im Kleinhirncortex	53
4.2.1. Auswertung der TMA^+ -Messungen	55
4.2.2. Auswertung der Li^+ -Messungen	60
4.2.3. Auswertung der K^+ -Messungen	64
4.2.4. K^+ -Messungen nach Applikation von Ouabain	67

5. Diskussion	70
5.1. Tetramethylammonium (TMA^+)	70
5.2. Lithium	71
5.3. Kalium	74
5.4. Die Aussagekraft der Diffusions- messungen	78
6. Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung

Der extrazelluläre Raum und das Stützgewebe des Nervensystems, die Gliazellen, wurden lange Zeit nur als das Medium angesehen, in dem sich die Neurone aufhalten. Diesen Nervenzellen wurden alle die Eigenschaften zugeschrieben, die das Funktionieren des Gehirns und des Zentralnervensystems bedingen.

In letzter Zeit haben verschiedene Experimente jedoch gezeigt, daß die Ionenzusammensetzung des extrazellulären Milieus Rückwirkungen auf die Neurone hat (34-35). Die Bedeutung der Gliazellen für die Informationsverarbeitung und den Ionentransport in Gehirn und Rückenmark wurde aufgedeckt (52-53). In diesem Zusammenhang interessierte vor allem, welche Mechanismen es für den Transport von Ionen innerhalb des Nervensystems und über die Blut-Hirnschranke hinweg gibt. Dazu wurden Diffusionsexperimente mit Hilfe einer iontophoretischen Punktquelle (30)(37) oder durch Superfusion von Hirnarealen mit einer angereicherten Testlösung für das zu messende Ion (12)(44) durchgeführt. Die Liquor-Hirnschranke wurde mittels cisterno-ventrikulärer oder subarachnoidaler Perfusion radioaktiver Marker untersucht (11)(20)(42-43).

Die Entwicklung ionensensitiver Mikroelektroden gestattete die Messung reizinduzierter K^+ -Anstiege im Extrazellulärraum (siehe z.B. (47)). Der Abtransport des vermehrt anfallenden Kaliums (die K^+ -Clearance) war Gegenstand einer Reihe von Arbeiten über Transportmechanismen im Nervensystem (1)(3)(15)(27-28)(59). Schließlich wurden Experimente zu den osmotischen Wirkungen der Ionentransporte durchgeführt, d.h. es wurden Änderungen des extrazellulären Volumens nach Reizung von Nervenzellpopulationen oder nach Anstieg der statischen Ionenkonzentrationen gemessen (5)(21).

Den Anstoß zu der vorliegenden Arbeit gaben Versuche über die in-vivo-Wirkungen von Lithium-Ionen am Ratten-Kleinhirn, die in den vergangenen Jahren hier in München durchgeführt wurden (57). Die meisten Angaben über den Transport bzw. die Diffusion von Li^+ -Ionen stammten aus in-vitro-Experimenten mit Erythrozyten (7-9)(41)(49) oder Kulturen von Nervenzellen (25-26)(48). Messungen der Li^+ -Konzentration mit Hilfe von ionenselektiven

Mikroelektroden wurden bis jetzt nur vereinzelt durchgeführt (18)(56). Als Ergänzung zu der Frage nach den Wirkungsmechanismen des Li sollte deshalb die Lithium-Diffusion im Kleinhirn quantitativ untersucht werden. Dazu war es erforderlich, den Bau und die Eichung der ionenselektiven Mikroelektroden den Anforderungen anzupassen, die von Diffusionsmessungen verlangt werden. Um die hier entwickelte Meßmethode mit den Arbeiten anderer Autoren vergleichen zu können, wurden neben Li^+ -Ionen auch Tetramethylammonium (TMA^+)- und K^+ -Ionen untersucht. Zusätzlich zu den Kleinhirnexperimenten wurde als Referenzwert immer auch die Diffusion in einer künstlichen Liquorflüssigkeit gemessen, die mit 3% Agar versetzt war.

2. Theorie der Diffusion

2.1. Freie Diffusion

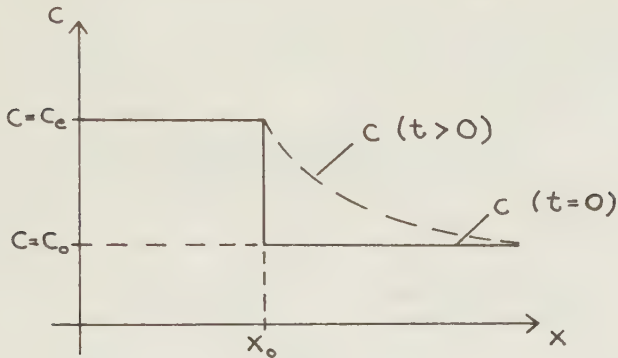


Abb.1 Schema der freien Diffusion

Die Diffusion wird durch die Fick'schen Gesetze beschrieben. Das 1. Fick'sche Gesetz beschreibt den Netto-Teilchenfluß durch eine Fläche A , wenn ein Konzentrationsgradient existiert

$$J = \frac{N}{At} = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1) \quad N: \text{Teilchenzahl}$$

Das 2. Fick'sche Gesetz ist eine Differentialgleichung für die Diffusion in einem abgeschlossenem Volumen

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Die Diffusionskonstante D hängt davon ab, wie oft die Teilchen bei der Bewegung zusammenstossen. Sie ist proportional zur mittleren freien Weglänge und zur mittleren Geschwindigkeit der Teilchen.

In dieser Arbeit wird die Diffusion verschiedener Ionen im Kleinhirncortex der Ratte und im Agar untersucht (siehe Abb.1, Bereich $x \gg x_0$). Dieses abgeschlossene Volumen soll an ein Gebiet grenzen, dessen Volumen sehr groß gegen den Cortex sein soll, und in dem das zu messende Ion die (praktisch) konstante Konzentra-

tion c_e hat (siehe Abb.1, Bereich $x < x_0$).

Für den Fall freier Diffusion gilt dann:

Gesucht ist eine Lösung der Differentialgleichung (2) $c(x,t)$ für $x > x_0$, die die folgenden Anfangsbedingungen erfüllt:

$$\begin{aligned} c(x_0, t) &= c_e && \text{für alle Zeiten } t \\ c(x, 0) &= c_0 && \text{für } x > x_0 \end{aligned}$$

Eine Funktion, die als Lösung der Differentialgleichung in Frage kommt, ist die komplementäre "error function" $\text{erfc}(z)$. Sie ist definiert durch:

$$\text{erfc}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_z^{\infty} e^{-\alpha^2} d\alpha \quad (3)$$

Weiterhin gilt:

$$\text{erfc}(z) = 1 - \text{erf}(z) \quad (4a) \quad \text{mit } \text{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-\alpha^2} d\alpha$$

$$\text{erfc}(-z) = 1 + \text{erf}(z) = 2 - \text{erfc}(z) \quad (4b)$$

$$\text{erfc}(0) = 1 \quad (4c) \quad \text{erfc}(\infty) = 0 \quad (4d)$$

Aus

$$\frac{\partial}{\partial t} \text{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) = \frac{x}{4\sqrt{Dt}} (t^{-3/2})(e^{-x^2/4Dt}) \quad (5a)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \text{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) = -\frac{1}{2\sqrt{Dt}} (e^{-x^2/4Dt}) \quad (5b)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \text{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) = \frac{x}{4D\sqrt{Dt}} (t^{-3/2})(e^{-x^2/4Dt}) \quad (5c)$$

und den Anfangsbedingungen ergibt sich als Lösung für die freie Diffusion:

$$c(x,t) = (c_e - c_0) \text{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) + c_0 \quad (6)$$

(siehe z.B. Zitat (4))

In Abschnitt 4 sind Beispiele für diese Funktion gezeigt.
(siehe auch Abb.1)

Die Grenzwerte von $c(x,t)$ sind:

$$\begin{aligned} c(x \rightarrow 0) &= c_e & c(x \rightarrow \infty) &= c_o \\ c(t \rightarrow 0) &= c_o & c(t \rightarrow \infty) &= c_e \end{aligned}$$

Die Konzentration erreicht keinen "steady state", sondern steigt stetig an, wenn auch mit abnehmender Geschwindigkeit:

$$\frac{dc}{dt} = - \frac{x(c_e - c_o)}{4\sqrt{D}} \frac{1}{(t^{3/2})} e^{-x^2/4Dt} \quad (7)$$

$$\rightarrow 0 \text{ für } t \rightarrow \infty, x = \text{const.}$$

Die Diffusionsgleichung läßt sich durch die Umformung

$$2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}\left(\frac{c - c_o}{c_e - c_o}\right) = \frac{x}{\sqrt{D}} \quad (8)$$

in eine Geradengleichung verwandeln. Aus der Steigung dieser Geraden kann man D bestimmen, wenn man eine Anzahl von Punkten $c(x,t)$ gemessen hat.

Für die Berechnungen am Tischrechner (Hewlett-Packard 9825A) wurden numerische Näherungen von erfc bzw. erfc^{-1} verwendet:

$$\operatorname{erfc}(z) = (a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3) e^{-z^2} + \mathcal{E}(z), \quad (9)$$

$$0 \leq z < +\infty$$

$$t = 1/1 + pz$$

$$|\mathcal{E}(z)| \leq 2.5 \times 10^{-5}$$

$$p = 0.47047$$

$$a_1 = 0.3480242$$

$$a_2 = -0.0958798$$

$$a_3 = 0.7478556$$

(siehe Zitat (2))

$$\operatorname{erfc}^{-1}(z) = 0.9 (-\ln(z(2-z)))^{1/2} + \mathcal{E}(z), \quad (10)$$

$$0 \leq z < +\infty \quad |\mathcal{E}(z)| \leq 10^{-2}$$

(siehe Zitat (55))

Die ursprüngliche Bedeutung der "error function" stammt aus der Statistik. Man mißt eine Größe A mehrmals hintereinander

(n mal), wobei die Einzelmessungen A_i um den Mittelwert

$$\bar{A} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A_i$$

zufallsverteilt sind. Für $n \rightarrow \infty$ geht die Verteilung der Meßpunkte in eine Gauß'sche Glockenkurve über (siehe Abb.2 - die error function unterscheidet sich von der Gauß'schen Wahrscheinlichkeitsfunktion nur um den Faktor $1/\sqrt{2}$). Die Funktion $\text{erf}(A)$ stellt die Menge der Meßpunkte dar (in Bruchteilen von 2), die links von A liegen; $\text{erfc}(A)$ umfaßt alle Meßpunkte rechts von A.

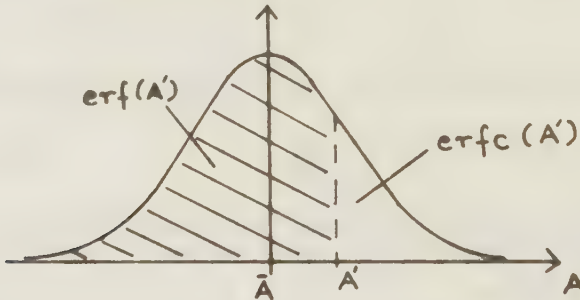


Abb.2 Die "error function" in der Statistik

Daß die Lösung der Diffusionsgleichung gerade auf diese Funktion führt, ist im statistischen Charakter der freien Diffusion begründet.

2.2. Diffusion mit Oberflächenbarriere

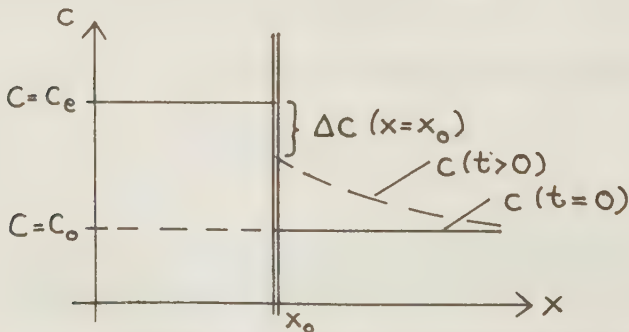


Abb.3 Diffusion mit Oberflächenbarriere (schematisch)

Eine Oberflächenbarriere an der Stelle $x = x_0$ bewirkt, daß der Netto-Teilchenfluß J pro Zeiteinheit in das Medium mit kleinerer Konzentration des Ions begrenzt ist. Als zusätzliche Randbedingung der Differentialgleichung (2) ergibt sich (siehe Zitat (42)):

$$J \Big|_{x=x_0} = -D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=x_0} = \alpha (c_e - c) \Big|_{x=x_0} \quad (11)$$

oder

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=x_0} = h (c - c_e) \Big|_{x=x_0} \quad \text{mit } h = \alpha/D$$

α ist die Permeabilitätskonstante der Barriere für das Ion (Dimension cm/s). h ist die "Barrierenkonstante". Die Dimension von h ist cm^{-1} oder mm^{-1} .

Als Lösung der Differentialgleichung ergibt sich

$$\frac{c - c_0}{c_e - c_0} = \text{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) - e^{h^2 Dt + hx} \text{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} + h\sqrt{Dt} \right) \quad (12)$$

Für $h = \infty$ ergibt sich die Lösung für die freie Diffusion. Für $h = 0$ ist die Barriere nicht penetrel. An der Stelle $x = x_0 = 0$ ergibt sich

$$c(0, t) = (c_e - c_0) (1 - e^{h^2 Dt} \text{erfc}(h\sqrt{Dt})) + c_0 \quad (13)$$

Es zeigt sich ein Konzentrationssprung

$$\Delta c(x=0, t) = (c_e - c_0) e^{h^2 Dt} \text{erfc}(h\sqrt{Dt}) \quad (14)$$

Eine solche Barrierenwirkung wird für die Pia mater beschrieben (43). Wie später gezeigt wird, gilt dies auch für die Arachnoidea.

Die Gleichung (8) trifft hier nicht mehr zu, d.h. die Diffusionsgleichung läßt sich nicht mehr linearisieren. Man kann jedoch aus den Gleichungen (12) und (14) durch Iteration die unbekannten Größen D und h bestimmen, indem man zum Beispiel D vorgibt, daraufhin h und D bestimmt, dieses D wieder an den Anfang der Iteration setzt usw. Diese Methode der Auswertung wurde in Abschnitt 4 verwendet.

2.3. Tortuosität und Volumenfraktion

Die Kleinhirnrinde besteht aus folgenden Kompartimenten (Teilvolumina):

- a. dem Intrazellulärraum (ICS) der Neurone und Gliazellen
- b. dem Extrazellulärraum (ECS)
- c. dem intravasalen Raum der Kapillaren

Diese Kompartimente sind untereinander durch die Zellmembranen der Neurone und Gliazellen sowie durch die Kapillarendothelien abgeteilt. Zum Liquorraum (bzw. im Experiment zur Superfusionsflüssigkeit) ist die Kleinhirnrinde von der Pia mater und der Arachnoidea begrenzt.

Wenn für eine bestimmte Ionensorte die Zellmembranen und die Kapillarendothelien undurchlässig sind, kann dieses Ion von der Arachnoidea her diffundieren und sich allein im ECS der Kleinhirnrinde verteilen. Es gelten die in 2.1. aufgestellten Gleichungen, wobei aber folgendes zu beachten ist (siehe Zitat 36):

a. Der ECS besteht aus den Zwischenräumen zwischen den Nerven- und Gliazellen und ist im allgemeinen sehr unregelmäßig geformt und gewunden (Tortuosität des ECS). Ein diffundierendes Ion wird nach einer gewissen Zeit immer an ein Hindernis stoßen und deshalb für eine bestimmte Strecke länger brauchen als in einem Medium ohne Hindernisse. Nimmt man, daß diese Hindernisse isotrop im ECS verteilt sind, ergibt sich als mathematische Beschreibung wieder Gleichung (6) bzw. (12), wobei aber D durch die effektive Diffusionskonstante D^* ersetzt wird mit

$$D^* = 1/\lambda^2 D \quad (15)$$

$\lambda \geq 1$ ist die Tortuositätskonstante.

b. Der ECS nimmt nur den Volumenanteil V_1 des gesamten Volumens ein, der ICS den Volumenanteil V_2 , wobei gilt

$$V_1 + V_2 = 1$$

Normalwerte sind $V_1 \sim 0.2$, $V_2 \sim 0.8$.(Das Kapillarvolumen ist vernachlässigbar klein.)

Dadurch ändert sich der Teilchenfluß durch eine Fläche (1. Fick'sches Gesetz):

$$J = -\alpha D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (16)$$

wobei $\alpha = \frac{V_1}{V_1 + V_2}$ die sogenannte Volumenfraktion (Zitat (36)) darstellt.

Da aber dieser kleinere Teilchenfluß in den um denselben Faktor α reduzierten ECS stattfindet, wird die räumliche Diffusion nicht beeinflusst und Gleichung (6) bzw. Gleichung (12) bleiben gültig (Zitat (35)). Die Volumenfraktion α tritt dabei nicht in Erscheinung.

Im Gegensatz dazu wird bei der Diffusion von einer iontophoretischen Punktquelle aus der Quellterm umso größer, je kleiner α ist (Zitat (37)). Die Lösung der radialen Diffusionsgleichung

$$c(r,t) = \frac{Q}{4\pi D r} \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (17),$$

wobei $Q = \frac{I n}{F}$ (I: Iontophoresestrom; n: Transportzahl des Ions; F: Faraday-Konstante)

geht dann über in

$$c(r,t) = \frac{Q}{4\pi \alpha D \cdot r} \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{2\sqrt{D \cdot t}}\right) \quad (18)$$

und α und λ lassen sich aus den Messungen getrennt bestimmen (Zitate (36-37)).

2.4. Das Drei-Kompartiment-Modell

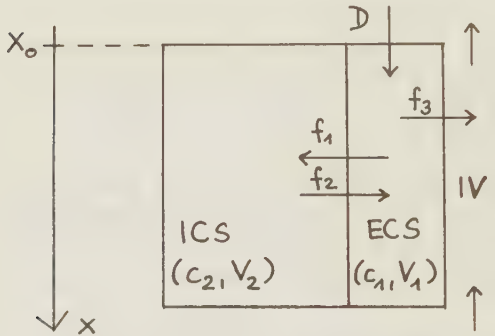


Abb.4. Das Drei-Kompartiment-Modell

Wenn man zulässt, daß Ionen die Zellmembranen und Kapillärwände passieren können, muss man die Diffusion von Ionen in der Kleinhirnrinde mit einem komplexeren Modell beschreiben (43). Das 3-Kompartiment-Modell (siehe Abb.4) umfaßt den ECS, den ICS und den intravasalen Raum (IV). Ionenverschiebungen sind möglich:

- von extra- nach intrazellulär (f_1)
- von intra- nach extrazellulär (f_2)
- von extrazellulär in die Kapillaren (f_3)

Der intravasale Raum ist im Vergleich zum cerebellären Cortex praktisch unbegrenzt und deshalb als offen eingezeichnet. Die Diffusion einer Ionensorte wird jetzt durch ein System von Differentialgleichungen beschrieben:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - k_{11}c_1 + k_{21}c_2 - k_{31}c_1$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} = k_{12}c_1 - k_{22}c_2$$
(19)

mit

$$k_{11} = f_1/V_1 \qquad k_{21} = f_2/V_1$$

$$k_{12} = f_1/V_2 \qquad k_{22} = f_2/V_2$$

$$k_{31} = f_3/V_1$$

Die Dimension der Übergangsrate f ist s^{-1} oder h^{-1} . Pro Zeiteinheit (s) und pro cm^3 Gewebe verlassen $(f_1+f_3)c_1$ Ionen den Extrazellulärraum und bewirken dort eine Konzentrationsabnahme $-(f_1+f_3)c_1/V_1$. Ein Teil davon strömt in den Intrazellulärraum und bewirkt dort eine Konzentrationszunahme $+f_1c_1/V_2$.

Im folgenden soll die Anwendbarkeit dieser Differentialgleichung auf typische Transportprozesse untersucht werden, wie sie an der Membran von Neuronen und Gliazellen vorkommen. Dabei soll zunächst die Diffusion nur von der Zeit abhängig sein (d.h. die Diffusion in x-Richtung ist gleich null, es werden nur transmembranale Flüsse berücksichtigt). Später wird diese Bedingung wieder aufgehoben (siehe Abschnitt 2.5.). Die Aufnahme in die Kapillaren, die vermutlich klein gegenüber den anderen Flüssen ist (Zitate (1),(20)), wird ebenfalls vernachlässigt.

Die vereinfachte Differentialgleichung heißt:

$$\begin{aligned}\frac{\partial c_1}{\partial t} &= -k_{11}c_1 + k_{21}c_2 \\ \frac{\partial c_2}{\partial t} &= k_{12}c_1 - k_{22}c_2\end{aligned}\tag{20}$$

Fall a:

Zwischen ECS und ICS existiert eine ungeladene, isotrope Barriere. Die treibende Kraft für den Ionentransport ist der Konzentrationsgradient (bzw. das chemische Potential). Im Gleichgewicht gilt

$$\begin{aligned}\frac{\partial c_1}{\partial t} &= \frac{\partial c_2}{\partial t} = 0 \\ &= -\frac{f_1}{V_1}c_1 + \frac{f_2}{V_1}c_2 = \frac{f_1}{V_2}c_1 - \frac{f_2}{V_2}c_2 = 0\end{aligned}\tag{21}$$

Da wegen der Isotropie der Barriere $f_1=f_2$, folgt daraus

$$c_1 = c_2$$

Fall b:

Zwischen ECS und ICS befindet sich eine elektrisch geladene Barriere (innen negativ, außen positiv). Die treibende Kraft ist jetzt der elektrochemische Gradient, und die vorgegebene Spannung E legt durch die Nernst-Gleichung das Verhältnis c_1/c_2 fest:

$$c_1/c_2 = \exp\left(\frac{EFz}{RT}\right) \quad (22)$$

F: Faraday-Konstante

R: Gaskonstante

T: absolute Temperatur

z: Ionenladungszahl

Damit sich ein Gleichgewicht ergibt, muß sich das Verhältnis der Flüsse einstellen:

$$c_1/c_2 = f_2/f_1 \quad (23)$$

Fall c:

Zwischen ECS und ICS findet ein aktiver Transport statt. Die treibende Kraft beruht auf einem energieverbrauchenden (ATP) Prozeß. Die Differentialgleichung lautet in diesem Fall:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = -\varphi_1/v_1 + \varphi_2/v_1 \quad (24)$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} = +\varphi_1/v_1 - \varphi_2/v_2$$

Dabei sind φ_1, φ_2 die Pumpraten (Enzymaktivitäten), z.B. in der Dimension mol/s .

Diese Pumpraten sind im allgemeinen komplizierte Funktionen $\varphi_1(c_1)$ bzw. $\varphi_2(c_2)$ der Konzentrationen c_1 und c_2 . Für die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe der Neuronen- bzw. Gliamembran läßt sich dieser Zusammenhang schematisieren (siehe Zitat (50)). Es ergibt sich eine sogenannte "Sigmoidkurve". Dabei bedeutet c_1 z.B. die extrazelluläre K^+ -Konzentration (siehe Abb.5).

Im physiologischen Bereich ("b" in der Abb.) arbeitet die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe annähernd linear. Entfernt man sich bei den einzelnen Ionen nach unten und nach oben nicht zu weit von diesem Bereich, kann man in erster Näherung ansetzen:

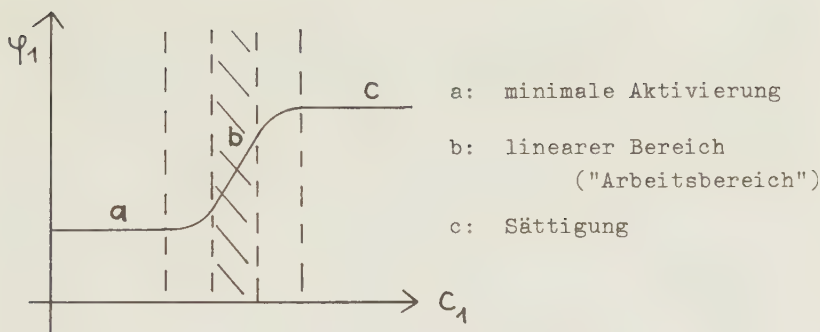


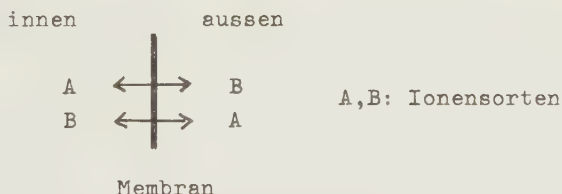
Abb.5. Charakteristik der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe

$$\psi_1 = f_1 c_1 \quad \psi_2 = f_2 c_2 \quad (25)$$

Damit erhält man wieder die beiden Ausgangsgleichungen(19)

Fall d:

Zwischen ICS und ECS findet ein Ionenaustausch statt (siehe z.B. die Zitate (7) und (49)).



Dieser Austausch erfolgt passiv ohne Verbrauch von Stoffwechselenergie. Ein Nettofluß eines Ions erfordert die Existenz eines Ionengradienten der anderen Ionensorte. Die Kinetik dieses Vorgangs wird für den $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$ -Austausch von Sarkadi et al. beschrieben (Zitat (49)). Abb.6 zeigt die Charakteristik der Li^+ -Aufnahme in die Zellen (für einen bestimmten Na^+ -Gradienten).

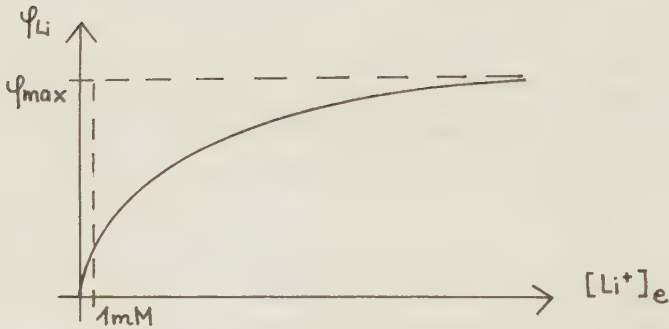


Abb.6. Stimulierung des Li^+ -Influx durch $(\text{Li}^+)_e$
(nach Zitat (49))

Im physiologischen (therapeutischen) Bereich ist dieses postulierte Transportsystem noch lange nicht gesättigt. Das bedeutet, daß die Aufnahme eine nichtlineare Funktion von $(\text{Li}^+)_e$ ($\hat{=} c_1$) ist:

$$\psi_1 = f_1(c_1)c_1 \quad (26)$$

und entsprechend $\psi_2 = f_2(c_2)c_2$

Die Differentialgleichung (19) wird durch diese Terme sehr kompliziert und ist nicht mehr analytisch lösbar. Wegen des physiologischen Na^+ -Gradienten ($(\text{Na}^+)_e/(\text{Na}^+)_i \sim 10:1$) überwiegt jedoch der durch den Ionenaustausch bewirkte Li^+ -Efflux den Li^+ -Influx bei weitem. Für relativ kurze Superfusionszeiten kann man deshalb beim Li^+ -Ion die Auswirkungen des Co-Transports vernachlässigen. In der Diskussion der Messergebnisse wird auf diesen Punkt noch näher eingegangen werden.

Fall e:

Eine Kombination der Fälle b, c und d lässt sich behandeln, indem man einfach die Übergangsraten addiert:

$$f_1 = f_1' + f_1'' + f_1''' + \dots$$

$$f_2 = f_2' + f_2'' + f_2''' + \dots$$

Dabei ist vorausgesetzt, daß die verschiedenen Transportprozesse an der Zellmembran einander nicht beeinflussen.

Diese Überlegungen haben gezeigt, daß sich typische Transportprozesse in das System von Differentialgleichungen (19) einbauen lassen. Die ursprünglichen Gleichungen erhält man, wenn man den Diffusionsterm $\partial^2 c / \partial x^2$ wieder hinzufügt. Wenn f allerdings keine Konstante ist (siehe z.B. Fall d) läßt sich das System (19) nur noch numerisch lösen.

2.5. Lösung der Differentialgleichung für das Drei-Kompartiment-Modell

Für das System zweier partieller Differentialgleichungen 2. Ordnung

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_1}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - (k_{11} + k_{31})c_1 + k_{21}c_2 \\ \frac{\partial c_2}{\partial t} &= k_{12}c_1 - k_{22}c_2 \end{aligned} \quad (19)$$

gelten die Anfangsbedingungen

$$\begin{aligned} c_1(x_0, t) &= c_e && \text{für alle Zeiten } t \\ c_1(x, 0) &= c_{10} && \text{für } x > x_0 \\ c_2(x, 0) &= c_{20} && \text{für } x > x_0 \end{aligned}$$

c_{10} und c_{20} sind dabei die Anfangskonzentrationen des Ions im ECS bzw. im ICS.

Wenn eine Oberflächenbarriere vorhanden ist, muß zusätzlich noch die Randbedingung

$$\left(\frac{\partial c_1}{\partial x} \right)_{x=x_0} = h(c - c_e) \Big|_{x=x_0} \quad (27)$$

berücksichtigt werden.

Die Lösung dieses Systems von Differentialgleichungen ist kompliziert. Deshalb sollen zunächst vereinfachte Ansätze versucht werden.

a. Vernachlässigung des Transportes $ICS \rightarrow ECS$ ($f_2=0$)

Für kurze Superfusionszeiten t und für $c_e \gg c_{20}$ ist der Einstrom in die Zellen groß gegenüber dem Auswärtsstrom. Man kann daher $f_2=0$ setzen und erhält:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_1}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - (k_{11} + k_{31})c_1 \\ \frac{\partial c_2}{\partial t} &= k_{12}c_1 \end{aligned} \quad (28)$$

Damit ist das Gleichungssystem entkoppelt, und man erhält als Lösung mit den obigen Anfangsbedingungen (unter Vernachlässigung der Oberflächenbarriere):

$$\begin{aligned} c_1(x, t) &= \frac{1}{2} (c_e - c_{10}) \left(e^{-x\sqrt{k/D}} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} - \sqrt{kt} \right) \right. \\ &\quad \left. + e^{+x\sqrt{k/D}} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} + \sqrt{kt} \right) \right) + c_{10} \\ c_2(x, t) &= \frac{1}{2} k_{12}c_e \left(\left(t - \frac{x}{2\sqrt{kD}} \right) e^{-x\sqrt{k/D}} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} - \sqrt{kt} \right) \right. \\ &\quad \left. + \left(t + \frac{x}{2\sqrt{kD}} \right) e^{+x\sqrt{k/D}} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} + \sqrt{kt} \right) \right) + c_{20} \end{aligned} \quad (29)$$

$$k = k_{11} + k_{31}$$

Der lineare Zusammenhang zwischen x und $2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c_1 - c_{10}/c_e - c_{10})$ ist jetzt verletzt (siehe Abb.7). Die berechneten Kurven sind leicht gekrümmt. Kurven für verschiedene Zeiten t fallen nicht mehr zusammen. Je größer der Einstrom nach intrazellulär ist (d.h. je größer f_1 ist), desto deutlicher ist die Abweichung.

Obwohl diese Lösung für große t unsinnig wird ($c_2(0, t) = k_{12}c_e t + c_{20} \rightarrow \infty$ für $t \rightarrow \infty$), kann man mit ihrer Hilfe doch qualitativ abschätzen, ob freie Diffusion vorliegt oder nicht:

α) Besteht derselbe lineare Zusammenhang zwischen x und $2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c_1 - c_{10}/c_e - c_{10})$ für alle Zeiten t und alle c_e , dann spricht dieser Befund für freie Diffusion im ECS.

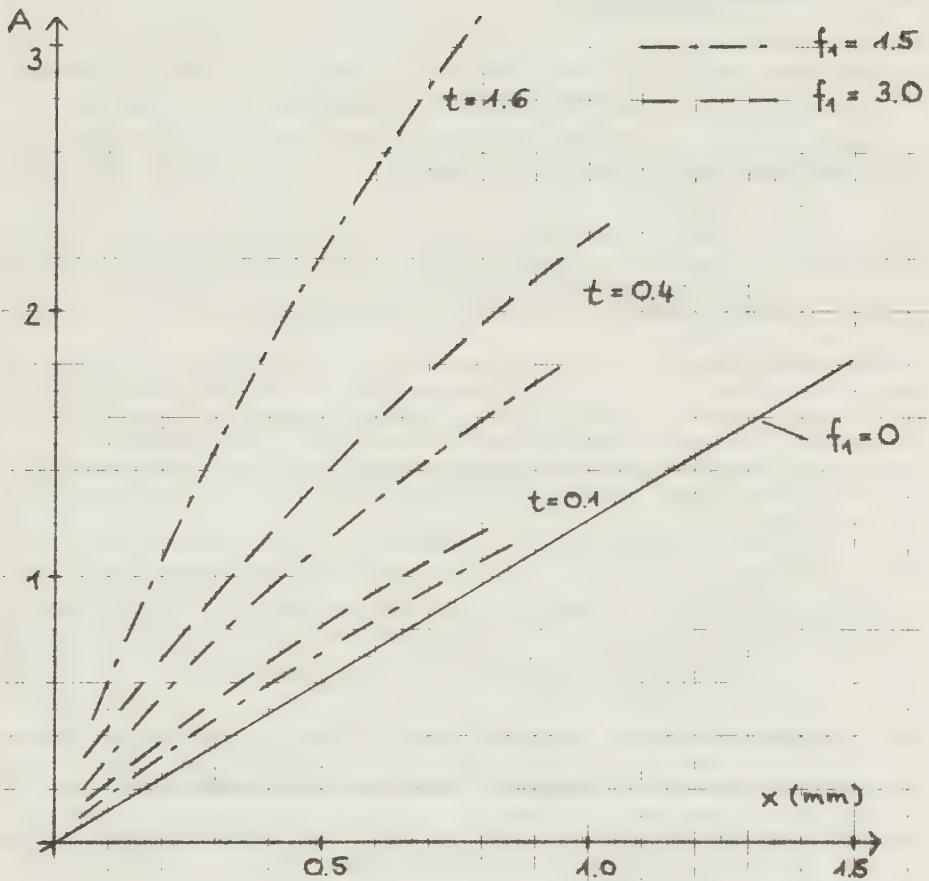


Abb.7. Rechenbeispiel für die Beziehung zwischen x und $A = 2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c - c_o / c_e - c_o)$ bei Aufnahme nach intrazellulär

($D = 0.7 \text{ mm}^2/\text{h}$ / $c_e = 30 \text{ mM}$ / $c_o = 0$ / $f_2 = 0$ / $h = \infty$)

ß) Ist der Zusammenhang nicht mehr linear oder ergeben sich verschiedene Kurven für verschiedene Zeiten t (Abb.7), dann spricht dieser Befund für Transportvorgänge zwischen ECS, ICS und IV.

b. Steady-state-Lösung

Wenn man postuliert, daß der Auswärtsstrom auch für große Zeiten gegenüber dem Einwärtsstrom vernachlässigt werden kann, erhält man für $t \rightarrow \infty$ die steady-state-Lösung der Differentialgleichung

$$0 = \frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - kc_1 \quad (30)$$

(siehe z.B. die Zitate (21)(35))

Mit Hilfe von

$$\operatorname{erfc}(-\infty) = 2$$

$$\operatorname{erfc}(+\infty) = 0$$

ergibt sich aus Gleichung (30) die Lösung

$$c_1(x,t) = (c_e - c_{10}) e^{-x\sqrt{k/D}} + c_{10} \quad (31)$$

Diese Gleichung kann man in eine lineare Beziehung umwandeln

$$\ln \frac{c_1 - c_{10}}{c_e - c_{10}} = -x\sqrt{k/D} \quad (32)$$

Das bedeutet, daß sich ein Konzentrationsgradient im Gewebe einstellt, der sich für große Meßzeiten nicht mehr ändert. Im Gegensatz dazu führt die Lösung für die freie Diffusion nie zu einem solchen Gleichgewicht (siehe Gleichung (7)). Mit Hilfe von Gleichung (6) erhält man

$$\ln \frac{c_1 - c_{10}}{c_e - c_{10}} = \ln \left(\operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right) \quad (33)$$

Diese Funktion ist in Abb.8 gegen x aufgetragen. Man sieht, daß sich keine lineare Beziehung mehr ergibt. Zum Vergleich ist eine Gerade mit der Transferkonstante $k=0.4 \text{ h}^{-1}$ dazu gezeichnet.

Obwohl diese steady-state-Lösung von einigen Autoren zur Bestimmung des Ionenstroms nach intrazellulär verwendet wird (Zitate (11)(21)(35)), erscheint ihre Anwendung als zweifelhaft. Die beiden Bedingungen für diese Lösung:

- Vernachlässigung des Auswärtsstromes gegenüber dem Einwärtsstrom
- Erreichen eines Gleichgewichtszustandes

schließen einander fast immer gegenseitig aus, denn die erste Bedingung gilt für kurze Zeiten, die zweite für lange Zeiten. Nur bei Ionen, die sehr langsam nach intrazellulär wandern, darf man die Gleichung (32) anwenden. Vermutlich ist dies schon beim TMA^+ -Molekül nicht mehr zulässig (siehe Abschnitt 4).

c. Komplette Lösung

Die Differentialgleichung (19) besteht aus einem System linearer, partieller Differentialgleichungen 2. Ordnung. Von ähnlicher Form sind die FitzHugh-Nagumo-Gleichungen, die die zeitliche und räumliche Ausbreitung eines Aktionspotentials am Tintenfischaxon nach dem Hodgkin-Huxley-Modell beschreiben (Zitate (13)(33)). Unter bestimmten Voraussetzungen ergibt sich dabei als Lösung eine wellenförmige Ausbreitung des Aktionspotentials (solitäre Welle). Im allgemeinen ist das System (19) jedoch nicht analytisch lösbar (Zitat (22)). Eine numerische Lösung der Diffusionsgleichung ist im Prinzip möglich, würde aber über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

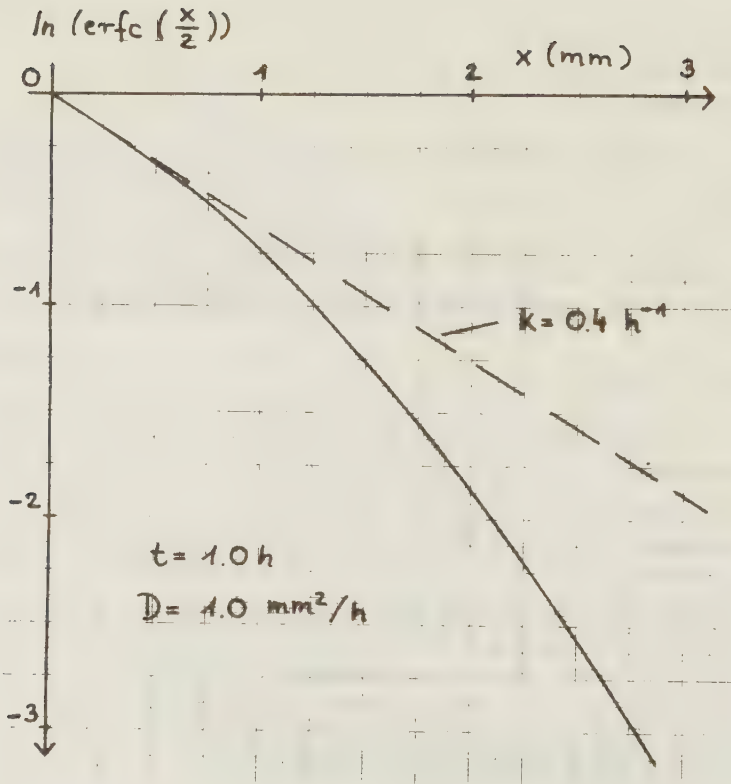


Abb.8. Rechenbeispiel für die Funktion $\ln(\operatorname{erfc}(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}))$ (ausgezogene Kurve). Die gestrichelte Kurve entspricht einer Geraden nach Gleichung (32) mit der Transferkonstante $k=0.4 \text{ h}^{-1}$.

2.6. Spatial buffering

Neben den passiven und aktiven Transportprozessen, die in Abschnitt 2.4. beschrieben wurden, existiert im Nervengewebe ein weiterer Mechanismus, der Ionenflüsse bewirken kann. Dieses "spatial buffering" (zu deutsch: räumliche Pufferung) wurde zum erstenmal von Orkand et al. (40) vermutet und später von verschiedenen Forschungsgruppen experimentell nachgewiesen (5)(15-16). Es handelt sich dabei um einen durch Anstieg des extrazellulären Kaliums erzeugten Kreisstrom in miteinander elektrisch gekoppelten Gliazellen. Man stellt sich den Vorgang so vor (siehe Abb.9):

a. Das Ruhepotential der Gliazellen entspricht dem K^+ -Gleichgewichtspotential

$$E_o = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_2} \quad (34)$$

b. Ein lokaler Anstieg des extrazellulären Kaliums an der Stelle x_o ($c_1' > c_1$) führt zu einer Änderung des K^+ -Gleichgewichtspotentials

$$E' = E_o + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1'}{c_1} \quad (35)$$

c. Der elektrochemische Gradient ($E' > E_o$) lässt K^+ -Ionen nach intrazellulär strömen, d.h. die Gliazellen depolarisieren ($E' > E_{Glia} > E_o$).

d. Die Depolarisation breitet sich elektrotonisch entlang den Nervenfortsätzen der gekoppelten Gliazellen aus

$$E_{Glia}(x) = E_{Glia}(x_o) e^{-(x-x_o)/l} \quad (36)$$

l ist dabei die elektrische Längskonstante des Syncytiums der Gliazellen.

e. An Stellen mit $x-x_o \ll l$ und unverändertem K^+ läßt der elektrochemische Gradient ($E_{Glia} > E_o$) K^+ -Ionen von intra- nach extrazellulär fließen.

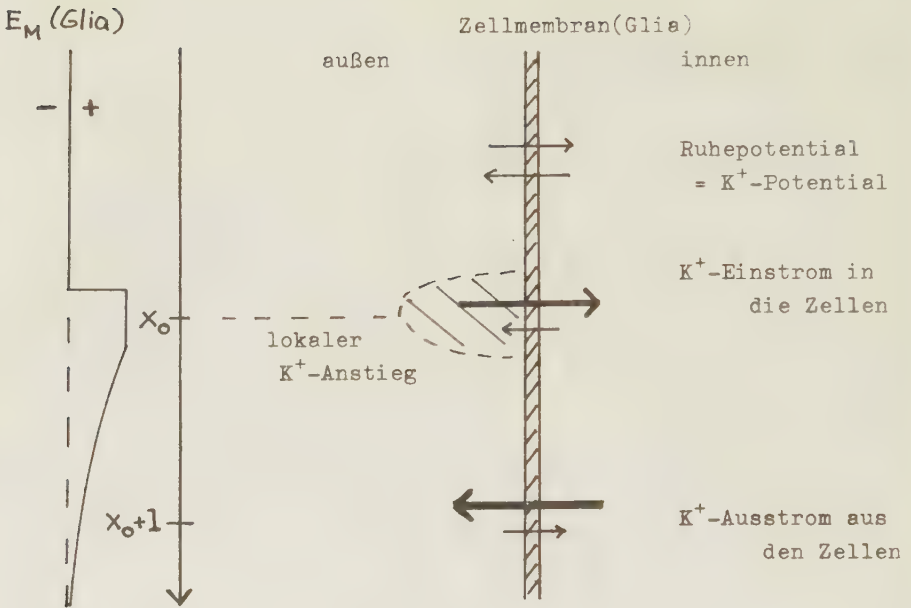


Abb.9. Mechanismus des "spatial buffering"

Dieser "spatial buffer"-Mechanismus führt dazu, daß man in Gleichung (19) beim K^+ einen neuen Term einführen muß:

$$f_{\text{buffer}} = p (E' - E_{\text{Glia}}) \quad (37)$$

Daraus folgt

$$f_{\text{buffer}} = p \left(E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_1} - E_{\text{Glia}}(x_0) e^{-(x-x_0)/l} \right) \quad (38)$$

Die Diffusionsgleichung erhält dann folgendes Aussehen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_1}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - k_{11}c_1 + k_{21}c_2 - k_{31}c_1 - k_{\text{buffer}}c_1 \\ \frac{\partial c_2}{\partial t} &= k_{12}c_1 - k_{22}c_2 + k_{\text{buffer}}c_1 \end{aligned} \quad (39)$$

mit

$$k_{\text{buffer}} = \frac{f_{\text{buffer}}}{V_1}, \quad k'_{\text{buffer}} = \frac{f_{\text{buffer}}}{V_2}$$

p ist eine Proportionalitätskonstante, die "Effektivität" des Buffer-Mechanismus.

Die komplizierte Form der Gleichung (39) verhindert die Lösung des Problems mit Hilfe eines geschlossenen Ausdrucks. Bei der Diskussion der K^+ -Messungen wird der Beitrag des "spatial buffering" in die Überlegungen mit einbezogen.

3. Ionenselektive Mikroelektroden (ISM)

3.1. Theorie der ISM

Ionenselektive Mikroelektroden, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, bestehen aus einer Glaskapillare, die vorne in eine feine Spitze ausgezogen ist (60). Diese Spitze ist mit einem flüssigen Ionenaustauscher gefüllt, der im Idealfall für genau eine Ionensorte Bindungsplätze besitzt und dieses Ion gegen andere Ionen austauschen kann. Normalerweise sind die Ionenaustauscher aus einem elektrisch geladenen Liganden und einem wasserunlöslichen Lösungsmittel zusammengesetzt (46). Der Rest der Kapillare wird mit einer Referenzlösung aufgefüllt, die das zu messende Ion in einer geeigneten Konzentration enthält. Die Verbindung zur elektronischen Meßeinrichtung wird mit Hilfe eines chlorierten Silberdrahtes hergestellt, der in die Referenzlösung eintaucht.

Diese ISM werden an eine Glaselektrode geklebt, die nur mit Elektrolytlösung gefüllt ist und als Referenzelektrode dient (Doppel-Elektrode). Manchmal werden auch zwei ISM und eine Referenzelektrode aneinandergeklebt, um zwei Ionensorten gleichzeitig messen zu können (Tripel-Elektrode). Die Spannung in den zwei bzw. drei Kanälen wird separat gegenüber einer Erdelektrode (MnO_2 -Elektrode) gemessen.

Die folgende schematische Abbildung soll zeigen, wie sich die Spannung zwischen dem ionenselektiven Kanal und der Erdelektrode zusammensetzt:

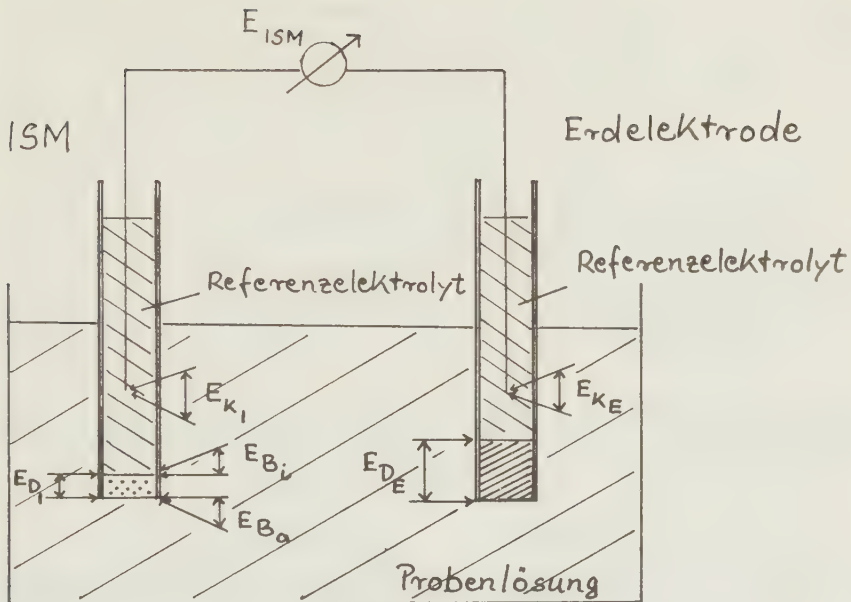


Abb.10. Meßanordnung mit einer ionenselektiven Mikroelektrode

E_{KI}, E_{KE} : Potentiale zwischen Silberdraht und innerer Referenzlösung von ISM bzw. Erdelektrode

E_{Bi}, E_{Ba} : Grenzflächenpotentiale (boundary potentials) zwischen Innen- und Außenseite der Ionenaustauschermembran und den angrenzenden Elektrolytlösungen

E_{DI} : Diffusionspotential innerhalb der Austauschermembran

E_{DE} : Diffusionspotential zwischen Referenzelektrolyt der Erdelektrode und der Probenlösung (liquid-junction potential)

E_{ISM} ist die Summe aller dieser Spannungen:

$$E_{ISM} = \underbrace{E_{K_I} - E_{K_E}}_{E_O} + \underbrace{E_{B_i} + E_{B_a} + E_{D_I} - E_{D_E}}_{E_M} \quad (40)$$

$E_O = E_{K_I} - E_{K_E}$ ist eine temperaturabhängige Größe, die nicht von der Probenlösung abhängt.

$E_M = E_{B_i} + E_{B_a} + E_{D_I}$ ist das gesamte Membranpotential am Ionenaustauscher.

Die Theorie der Austausch- und Diffusionsvorgänge an Grenzflächen zwischen Elektrolyten und Membranen wurde zunächst von Planck (45), später von Henderson (23) untersucht. Für die Diffusionspotentiale gilt die Henderson-Gleichung:

$$E_D = \frac{m}{\sum_m z_m^2 u_m \Delta c_m + \sum_x z_x^2 u_x \Delta c_x} \frac{RT}{F} \ln \frac{m}{\sum_m z_m^2 u_m c_m^i + \sum_x z_x^2 u_x c_x^i} \quad (41)$$

m: Kationen x: Anionen i: innen a: außen

Die Summation umfaßt alle in den Lösungen vorkommenden Ionen.

$$\Delta c_m = c_m^i - c_m^a \quad \Delta c_x = c_x^i - c_x^a$$

z_m, z_x : Ionenladungen u_m, u_x : Ionenbeweglichkeiten

R: Gaskonstante F: Faraday-Konstante

T: absolute Temperatur

Für das Membranpotential wurde von Nikolsky und Eisenman (10)(38) eine semiempirische Gleichung aufgestellt:

$$\begin{aligned} E_M &= E_O + \frac{RT}{z_D F} \ln \left(a_D + \sum_{\mu \neq D} x_{\nu\mu} (a_\mu)^{z_\nu/z_\mu} \right) \\ &= E_O + \frac{59.16 \text{ mV}}{z_D} \log \left(a_D + \sum_{\mu \neq D} x_{\nu\mu} (a_\mu)^{z_\nu/z_\mu} \right) \quad (42) \end{aligned}$$

(bei 25° C)

z_{ν}, a_{ν} sind Ladungszahl bzw. Aktivität des zu messenden Ions

z_{μ}, a_{μ} sind Ladungszahl bzw. Aktivität anderer in der Probenlösung vorkommender Ionen

$\chi_{\nu\mu}$ ist die Selektivitätskonstante, die die Präferenz des Ionenaustauschers für das Ion ν gegenüber dem "Störion" μ angibt. Da diese Selektivitätskonstante konzentrationsabhängig ist, muß immer angegeben werden, bei welcher Konzentration des Ions ν sie bestimmt wurde.

Im Idealfall ($\chi_{\nu\mu}=0$ für alle $\mu \neq \nu$) ergibt sich die Nernst-Gleichung

$$E_M = E_O' + \frac{59.16 \text{ mV}}{z_{\nu}} \log a_{\nu} \quad (43)$$

Wie Morf und Simon (32) gezeigt haben, führt eine theoretische Ableitung der Grenzflächenpotentiale E_{B_i} und E_{B_a} zu einem Ausdruck für das Membranpotential E_M , der leicht in eine Gleichung vom Nikolsky-Typ umgeformt werden kann.

Die Spannung zwischen der Referenz- (Elektrolyt-) Elektrode und der Erdelektrode ist die Differenz zweier Diffusionspotentiale, da in der Referenzelektrode keine Grenzflächenpotentiale vorkommen:

$$E_{\text{Ref}} = E_O' + E_{D_R} - E_{D_E} \quad (44)$$

Diese Spannungsdifferenz läßt sich mit Hilfe der Henderson-Gleichung berechnen.

Zur Elimination von rein elektrischen Signalen bei der Messung im Kleinhirncortex wird nicht E_{ISM} aufgezeichnet, sondern

$$E_{\text{ISM}} - E_{\text{Ref}} = E_O - E_O' + E_M - E_{D_R} \quad (45)$$

const.

Die wichtigsten Ausdrücke dieses Abschnitts sind hier noch einmal zusammengefaßt:

$$\begin{aligned} E_{ISM} &= \text{const.} + E_M - E_{D_E} \\ E_{Ref} &= \text{const.} + E_{D_R} - E_{D_E} \\ E_{ISM} - E_{Ref} &= \text{const.} + E_M - E_{D_R} \end{aligned} \quad (46)$$

Um die einzig wichtige Größe E_M richtig messen zu können, muß man entweder in Gleichung (46) E_{D_E} rechnerisch eliminieren (dies geschieht beim Eichen der Elektroden - siehe Abschnitt 3.5), oder man muß die Innenlösung der Referenzelektrode so wählen, daß E_{D_R} bei allen vorkommenden Probenlösungen vernachlässigbar klein ist (dies geschieht beim Messen im Kleinhirncortex und im Agar).

In Tabelle 1 wurde als Beispiel das Diffusionspotential einer Referenzelektrode (200 mM KCl in den drei Na^+ -Eichlösungen berechnet. Dabei wurde in den Lösungen 4, 5 und 6 die Ionenstärke durch Zufügen einer entsprechenden Menge MgCl_2 ungefähr konstant gehalten. Dadurch lassen sich die Sprünge von E_{D_R} auf ca. 25-30 % reduzieren. Die in der Rechnung verwendeten Ionenbeweglichkeiten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Eine weitere Reduzierung der Diffusionspotentialunterschiede läßt sich erreichen, wenn man Lösungen mit gleicher Anionen- und Kationenbeweglichkeit verwendet (z.B. KCl, Li-Acetat).

Unter bestimmten, nicht ganz geklärten Voraussetzungen (31) können an der Spitze der ISM sogenannte "tip potentials" (Spitzenpotentiale) auftreten. Diese "tip potentials" werden durch elektrische Ladungen an der Pipettenspitze verursacht und können die Messung erheblich stören, da sie sich den übrigen Elektrodenpotentialen überlagern. Man erkennt "tip potentials" bei der Elektrodeneichung daran, daß die Referenzseite viel größere Sprünge zwischen verschiedenen Lösungen zeigt, als sich nach der Henderson-Gleichung ergeben sollte. In diesem Falle bleibt nichts anderes übrig, als die Spitze der Elektroden vorsichtig abzubereiten. Dadurch kann man meist die Spitzenpotentiale zum Verschwinden bringen.

	E_{D_R} (mV)	
Lösung 1 (10 mM NaCl + 5 mM LiCl)	- 0.57	} $\Delta E_{D_R} = 0.83$ mV
Lösung 2 (30 mM NaCl + 5 mM LiCl)	- 1.40	
Lösung 3 (90 mM NaCl + 5 mM LiCl)	- 2.91	} $\Delta E_{D_R} = 1.51$ mV
Lösung 4 (Lösung 1 + 35 mM $MgCl_2$)	- 4.99	
Lösung 5 (Lösung 2 + 30 mM $MgCl_2$)	- 4.78	} $\Delta E_{D_R} = 0.50$ mV
Lösung 6 (Lösung 3 + 15 mM $MgCl_2$)	- 4.28	

Tabelle 1. Mit Hilfe der Henderson-Gleichung berechnete Diffusionspotentiale für eine mit 200 mM KCl gefüllte Referenzelektrode in verschiedenen Lösungen

Na^+	54.7	Mg^{2+}	29.0
K^+	80.0	Cl^-	81.1
Li^+	42.4	HCO_3^-	46.0
Ca^{2+}	32.2	HPO_4^{2-}	37.3
Acetat ⁻	43.8		

Tabelle 2. Ionenbeweglichkeiten $u_i \times 10^{10} \text{ J}^{-1} \text{ mol cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bei 25°C (6)(19)

3.2. Aktivitäten und Konzentrationen

Die ionenselektiven Mikroelektroden messen die Aktivitäten von Ionen in der Probenlösung. Für die Untersuchung der Diffusionsprozesse interessiert aber die Ionenkonzentration. Beide Größen sind über den Aktivitätskoeffizienten φ miteinander verknüpft:

$$a = \varphi c \quad (47)$$

Dieser Aktivitätskoeffizient hängt ab von der Ionenstärke des Mediums

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (48)$$

und von der Zahl der Ladungen des Ions. Dieser Zusammenhang läßt sich im allgemeinen nur empirisch ermitteln. Im Bereich physiologischer Konzentrationen ($\sim 300 \text{ mOsm/l}$) kann man φ jedoch mit hinreichender Genauigkeit aus folgender Formel entnehmen (Zitat (31)):

$$-\log \varphi = \frac{Az^2\sqrt{\mu}}{1+\sqrt{\mu}} \quad (49)$$

Die Konstante A beträgt bei 25°C in wässriger Lösung 0.5108.

Wenn bei der Eichung der ISM Lösungen verschiedener Ionenstärken verwendet wurden (siehe 3.5), wurde φ aus der Zusammensetzung dieser Lösungen bestimmt und in die Nikolskygleichung (42) wurden Aktivitäten eingesetzt.

Beispiel: Eichung der Li^+ -Elektrode

Lösung	φ	a_{Li} (mM)	a_{Na} (mM)
0.15 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.72	0.11	108
20 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.71	14.2	106.5
50 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.695	34.75	104.25

Ebenso muß man bei der Eichung mit Aktivitäten rechnen, wenn zweiwertige Ionen in den Probenlösungen vorkommen (siehe Ca^{2+} -Selektivität - Abschnitt 3.5), da sich für zweiwertige Ionen nach Gleichung (49) andere Aktivitätskoeffizienten ergeben.

Bei der Messung der Diffusionsvorgänge im Agar bzw. im cerebellaren Cortex wurde jedoch darauf geachtet, daß sich die Ionenstärke nur sehr wenig änderte. Deshalb konnten hier Konzentrationsunterschiede aus den Elektroden-Meßkurven berechnet werden (siehe Kapitel 4). Wenn man $a = \varphi c$ mit $\varphi = \text{const.}$ in die Nikolsky-Gleichung einsetzt, sieht man, daß sich die Aktivitätskoeffizienten wegekürzen. Die Einhaltung einer bestimmten Ionenstärke bringt, wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, zudem noch den Vorteil, daß keine Änderungen der Diffusionspotentiale an der Referenzelektrode bzw. der Erdelektrode auftreten.

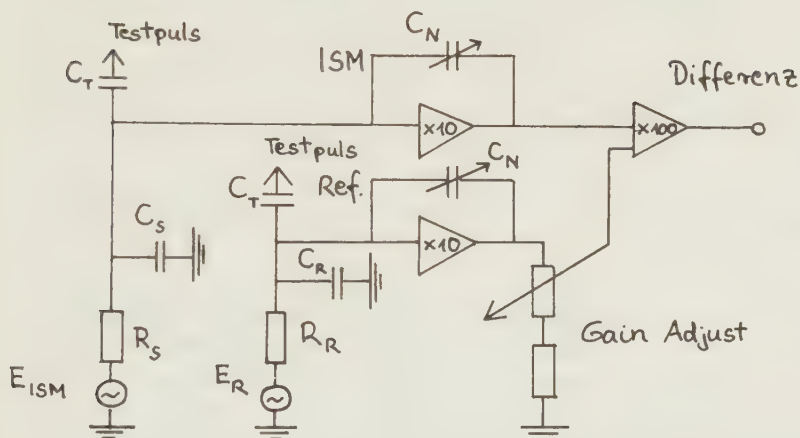
3.3. Bau der ionenselektiven Mikroelektroden

Ionenselektive Mikroelektroden wurden aus einem Borsilikatglas (Clark Electromedical Instruments) mit einem äußeren Spitzendurchmesser von 1-2 μm gezogen. Die ionensensitiven Kanäle wurden mit einem Tropfen Hexamethyl-disilazan (Sigma) gefüllt und dann 30 min. bei 400°C gebacken (18). Dann wurde der entsprechende Ionenaustauscher in die Spitze gegeben und das restliche Volumen der Kapillare mit Referenzelektrolyt gefüllt (siehe Tabelle 3). Die Referenzelektroden für die konventionelle Messung der elektrischen Feldpotentiale wurden mit einem geeigneten Elektrolyten gefüllt (Tabelle 3). Nach dem Einlegen von Ag/AgCl-Drähten wurden die Elektroden mit Wachs verschlossen.

Elektrode	Ionen-Austauscher	Referenz-Elektrolyt	$R_S(\Omega)$	Ref.-Elektrode	$R_P(\Omega)$
K^+	Corning 477317	200 mM KCl	$\sim 5 \times 10^9$	150 mM NaCl	$\sim 5 \times 10^6$
TMA ⁺	Corning 477317	2mM TMA ⁺ + 150 mM KCl	$\sim 5 \times 10^9$	150 mM NaCl	$\sim 5 \times 10^6$
Li^+	siehe Zitat (56)	200 mM LiCl	$\sim 3 \times 10^{10}$	150 mM NaCl	$\sim 5 \times 10^6$
Na^+	siehe Zitat (54)	200 mM NaCl	$\sim 1 \times 10^{11}$	150 mM KCl	$\sim 5 \times 10^6$

Tabelle 3. Charakteristiken der in dieser Arbeit verwendeten ionenselektiven Mikroelektroden

3.4. Messung der Ionensignale



- | | |
|------------|---|
| E_{ISM} | Potential der ionensensitiven Elektrode |
| E_R | Potential der Referenzelektrode |
| R_S, C_S | Widerstand bzw. Kapazität der ionensensitiven Elektrode |
| R_R, C_R | Widerstand bzw. Kapazität der Referenzelektrode |
| C_N | Kapazitätsneutralisation |
| C_T | Koppelkapazität für den Testpuls |

Abb.11. Schaltbild der Verstärkerschaltung

Den Aufbau der elektronischen Meßschaltung zeigt Abb.11. Die Signale der hochohmigen Elektroden ($R_S \sim 10^{11} \Omega$, $R_R \sim 10^7 \Omega$) werden getrennt auf die Eingänge von 2 Impedanzwandlern mit hohem Eingangswiderstand gegeben (siehe Tabelle 4). Ein nachgeschalteter Differenzverstärker bildet das Signal $E_{ISM} - E_R$ und verstärkt dieses 100fach. Die Ausgangsspannung wird auf verschiedene Displays gegeben (xy-Schreiber, Oszillograph, Vielkanalanalysator).

	Eingangs- widerstand	Eingangs- strom	Spannungs- verstärkung
Referenzseite	$> 10^{11} \Omega$	10 pA	x10
ionensensitive Seite	$\sim 10^{15} \Omega$	max. 0.1 pA	x10

Tabelle 4. Daten der Impedanzwandler für die Elektroden

Mit Hilfe des "gain adjust"-Trimmers kann die Verstärkung der Elektrodenseite eingestellt werden, um Spannungsabfälle in den Meßelektroden zu kompensieren. Die Kapazitätsneutralisation dient zur Unterdrückung der Elektrodenkapazität (C_S , C_R). Dazu wird über eine Koppelkapazität C_T ein rechteckiger Testpuls auf die Elektrode gegeben. Über C_N wird die verstärkte Eingangsspannung an den Eingang phasengleich zurückgekoppelt. Durch Variieren von C_N erhält man die beste Kompensation.

3.5. Eichung der ionenselektiven Mikroelektroden

Die Eichung der ISM soll einen Zusammenhang liefern zwischen den gemessenen Spannungsdifferenzen an der Elektrode und den Konzentrationsunterschieden in den Probenlösungen. Dazu muß ermittelt werden:

- die Steilheit der Elektrodenantwort (mV pro Dekade)
- der Einfluß der übrigen Ionen im Medium

In dieser Arbeit wurde als Referenzlösung für Messungen im Cerebellum ein künstlicher Liquor verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 5 angegeben ist. Dieser künstliche Liquor entspricht ungefähr der Ionenzusammensetzung des Extrazellulär-raums im Kleinhirncortex. Für die Agarversuche wurde dieser künstliche Liquor mit 3% Agar angerührt und eingedickt. In den Tabellen 6 bis 8 sind die vom Hersteller angegebenen theoretischen Selektivitätskonstanten aufgelistet.

Na^+	151 mM	Cl^-	132 mM
K^+	3.5 mM	HCO_3^-	25 mM
Ca^{2+}	1.1 mM	HPO_4^{2-}	0.5 mM
Mg^{2+}	0.8 mM		

Tabelle 5. Ionenkonzentrationen im künstlichen Liquor

K^+	0.3
Li^+	0.4
Ca^{2+}	0.03
Mg^{2+}	0.0025

Tabelle 6. Selektivitätskonstanten für den Na^+ -Austauscher (Zitat (54))

Na^+	0.04
K^+	0.006
Ca^{2+}	0.25
Mg^{2+}	0.0025

Tabelle 7. Selektivitätskonstanten für den Li^+ -Austauscher (Zitat (56))

Na^+	0.016
Li^+	0.003
Ca^{2+}	0.006
Mg^{2+}	0.002

Tabelle 8. Selektivitätskonstanten für den K^+ -Austauscher (Corning Nr. 477317)

Aus den Tabellen 6 bis 8 ist zu ersehen, daß folgende Ionen als "Störionen" die Messungen beeinflussen können:

- Ca^{2+} bei der Li^+ -Messung
- Na^+ bei der K^+ -Messung
- Na^+ bei der Li^+ -Messung
- Li^+ bei der Na^+ -Messung

Der theoretische Zusammenhang zwischen Spannung, Steilheit, Aktivitäten und Selektivitätskonstanten (die sogenannte "Elektrodenfunktion") läßt sich allgemein in der Nikolsky-Form schreiben:

$$\Delta E = t \log \frac{a_2 + a_0'}{a_1 + a_0'} \quad (50)$$

mit $a_0 = \sum_i \chi_i b_i$, $a_0' = \sum_i \chi_i b_i'$

ΔE : Spannungssprung (in mV)

t: Steilheit (in mV/Dekade)

a_2, a_1 : Aktivität des zu messenden Ions in zwei Probenlösungen

b_i', b_i : Aktivitäten der Störionen in diesen Lösungen

χ_i : Selektivitätskonstanten gegenüber den einzelnen Störionen

a_0', a_0 : störende "Hintergrund"-Aktivität

Die gebräuchlichste Methode der Elektrodeneichung besteht darin, daß man den "Hintergrund" konstant läßt und die Konzentration des zu messenden Ions variiert (31). Daraus kann man dann in einem halblogarithmischen Maßstab eine Eichkurve zeichnen (siehe Abbildung 12). Diese Eichkurve entspricht bei den in dieser Arbeit verwendeten ISM immer einer Nikolsky-Funktion (Gleichung (50)), wie wiederholte Untersuchungen ergeben haben. Da jede solche Funktion durch drei Punkte eindeutig festgelegt ist (siehe Abb. 12), genügt es, wenn man zwei Spannungssprünge genau vermißt. Mathematisch bedeutet dies die Lösung von zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten:

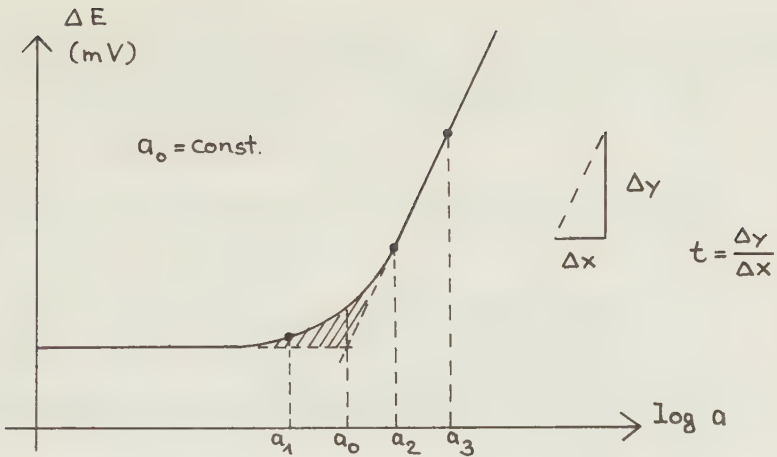


Abb.12. Theoretische Eichkurve der ISM. a_0 entspricht dem Schnittpunkt des horizontalen und des linearen, ansteigenden Teils der Kurve. Durch 3 Punkte (a_1, a_2, a_3) und ihre Funktionswerte ist die Kurve eindeutig bestimmt.

Sprung von a_1 nach a_2 :
$$\Delta E_1 = t \log \frac{a_2 + \chi b_2}{a_1 + b_1} \quad (51)$$

Sprung von a_2 nach a_3 :
$$\Delta E_2 = t \log \frac{a_3 + \chi b_3}{a_2 + b_2}$$

Dabei dürfen sich sogar die Aktivitäten der Störionen verändern. Diese beiden Gleichungen wurden nach t bzw. χ aufgelöst:

$$t = \frac{\Delta E_2}{\log \frac{a_3 + \chi b_3}{a_2 + \chi b_2}} \quad (52)$$

$$\chi = \frac{a_1 \cdot 10^{\frac{\Delta E_1}{t}} - a_2}{b_2 - 10^{\frac{\Delta E_1}{t}} b_1}$$

Gleichung (52) wurde iterativ gelöst, d.h. es wurden plausible Anfangswerte für t und χ eingesetzt, das neue Ergebnis wurde wieder eingesetzt usw. Nach etwa 10 Schritten waren die beiden gesuchten Parameter mit einer (mathematischen) Genauigkeit von $<1\%$ bestimmt.

Diese Methode funktioniert nur, wenn man die drei benötigten Eichlösungen sorgfältig aussucht. Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein:

- die beiden Spannungssprünge sollten normalerweise (bei guten Elektroden) größer als 20 mV sein, um alle apparatbedingten Meßfehler klein zu halten
- die Ionenstärken der Eichlösungen sollten sich nur wenig ändern (siehe die Abschnitte 3.1 und 3.2)
- die Konzentrationen aller Ionen in den Eichlösungen müssen genau bekannt sein

Die Tabellen 9 bis 11 enthalten die in diesen Versuchen verwendeten Eichlösungen; diese eigneten sich aufgrund zahlreicher Experimente dafür am besten. Außerdem sind in diesen Tabellen die Ionenstärken, Aktivitätskoeffizienten, Diffusionspotentiale, sowie ein Korrekturfaktor für die Eichung eingetragen. Dieser Korrekturfaktor wird auf den nächsten Seiten erklärt.

Eichlösung	μ	φ	E_{DE}	Korr.
0.15 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.150	0.72	-0.87	-
20 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.170	0.71	-1.74	-1
50 mM LiCl + 150 mM NaCl	0.200	0.69	-2.90	-1
0.15 mM LiCl + 150 mM NaCl + 1 mM CaCl ₂	0.153	0.72	-1.04	0

Tabelle 9. Lösungen für die Eichung der Li⁺-Elektrode

Eichlösung	μ	φ	E_{DE}	Korr.
10 mM NaCl + 5 mM LiCl + 35 mM MgCl ₂	0.120	0.74	-1.37	-
30 mM NaCl + 5 mM LiCl + 30 mM MgCl	0.125	0.74	-1.31	0
90 mM NaCl + 5 mM LiCl + 15 mM MgCl	0.140	0.73	-1.19	0

Tabelle 10. Lösungen für die Eichung der Na⁺-Elektrode

Eichlösung	μ	φ	E_{DE}	Korr.
3 mM KCl + 150 mM NaCl	0.153	0.72	-0.91	-
12 mM KCl + 150 mM NaCl	0.162	0.71	-0.89	0
60 mM KCl + 150 mM NaCl	0.210	0.69	-0.82	0

Tabelle 11. Lösungen für die Eichung der K⁺-Elektrode

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen (Ausnahme: TMA⁺) wurden mit einem Atom-Absorptionsspektrometer (Perkin-Elmer 380) nachgemessen. Die Genauigkeit des Gerätes für Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ betrug etwa 1%, für K⁺ 2%, für Na⁺ 3%. Die Standardlösungen wurden nach den Angaben des Herstellers aus Titrisol^R-Lösungen (Fa. Merck) zubereitet.

Die Berechnung der Eichkurven und die Umrechnung von Spannungs- in Konzentrationsunterschiede geschah mit Hilfe eines Tischrechners (Hewlett-Packard 9825 A). Für jeden Einzel-

schritt wurde ein kleines Programm in der Sprache des Rechners (HPL) geschrieben und auf Kassette gespeichert.

Die Elektrodeneichung geschah auf einem eigenen Test-Set. Dieses bestand aus einem abgeschirmten Käfig mit der Elektrode und der Probenlösung, zwei Verstärkern (siehe Abschnitt 3.4) und einem Schreiber. Im Gegensatz zur Messung am Cerebellum bzw. am Agar wurden ionensensitiver Kanal und Referenzkanal einzeln aufgezeichnet, um fehlerhafte Elektroden sofort erkennen zu können. Der Schreiberausschlag wurde regelmäßig mit einem Spannungsnormale (Batterie) geeicht.

Die gemessenen Potentialdifferenzen zwischen den Eichlösungen müssen noch für die Diffusionspotentiale korrigiert werden, die zwischen Erdelektrode und Probenlösung entstehen. Diese Erdelektrode ist mit einer Schicht aus Agar verschlossen, die dieselbe Ionenzusammensetzung hat wie der künstliche Liquor. In den Tabellen 9 bis 11 sind die Diffusionspotentiale E_{D_E} , wie sie sich aus der Henderson-Gleichung ergeben, verzeichnet. Daneben steht der (gerundete) Korrekturwert. Nur bei der Li^+ -Eichung muß man bei den gemessenen Spannungssprüngen jeweils 1 mV abziehen.

Die Aktivitätskoeffizienten aller Eichlösungen wurden nach Gleichung (49) berechnet, und damit die Konzentrationen in Aktivitäten umgerechnet. Die Koeffizienten φ stehen ebenfalls in den Tabellen 9 bis 11.

Die Ergebnisse der Elektrodeneichung im einzelnen:

a. K^+ -Elektrode

Die Steigung der Elektrode und ihre Selektivität gegenüber 150 mM Na^+ wurde bestimmt. Als Mittelwert (mit Standardabweichung) der in den Experimenten verwendeten Elektroden ergab sich:

$$\begin{aligned} t &= 59.7 \pm 1.7 \text{ mV} \\ \alpha_{150} &= 0.013 \pm 0.005 \end{aligned} \quad (n = 11)$$

Die Umrechnung von Spannungsdifferenzen in Konzentrationsunterschiede geschieht mit Hilfe der Nikolsky-Gleichung (unter der Voraussetzung konstanter Ionenstärke)

$$c_2 = 10^{\Delta E/t} (c_1 + \chi_{c_{Na}}) - \chi_{c_{Na}} \quad (53)$$

b. Na⁺-/Li⁺-Elektrode

Die Na⁺-Messung und die Li⁺-Messung stören sich gegenseitig. Deshalb ist eine vernünftige Messung von Li⁺-Änderungen im ECS nur möglich, wenn man Tripelelektroden verwendet, die beide Konzentrationen gleichzeitig messen. Zusätzlich muß man noch die Selektivität des Li⁺-Kanals gegenüber Ca²⁺ bestimmen, indem man zur niedrigsten Li⁺-Eichlösung 1 mM CaCl₂ dazugibt.

Für die dadurch entstandene Spannungsdifferenz gilt:

$$\Delta E = t \log \frac{\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}} + \chi_{Ca} (\varphi_2^{c_{Ca}})^{1/2}}{\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}}}$$

(Konzentrationen in M)

$$\text{bzw. } \Delta E = t \log \frac{\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}} + \chi_{Ca} (1000 \varphi_2^{c_{Ca}})^{1/2}}{\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}}}$$

(Konzentrationen in mM)

(54)

Die Selektivitätskonstante gegenüber Ca²⁺ ergibt sich daraus zu

$$\chi_{Ca} = \frac{1}{\sqrt{1000 \varphi_2^{c_{Ca}}}} (10^{\Delta E/t} (\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}}) - (\varphi_1^{c_{Li}} + \varphi_1 \chi_{150^{c_{Na}}})) \quad (55)$$

Dabei sind φ_1 und φ_2 die Aktivitätskoeffizienten in den Eichlösungen für einwertige ($\varphi_1 \sim 0.72$) und zweiwertige Ionen ($\varphi_2 \sim 0.26$).

Resultate der Li^+ -Eichung:

$$t = 58.5 \pm 4.6 \text{ mV}$$

$$K_{150} = 0.042 \pm 0.005 \quad (n=10)$$

$$K_{\text{Ca}} = 0.28 \pm 0.07$$

Einige Li^+ -Elektroden haben kurz nach dem Bauen eine übersteile Eichkurve ($t \sim 70 \text{ mV}$) (vergleiche z.B. Zitat (39)). Nach etwa 24 Stunden ist die Steigung jedoch wieder in Übereinstimmung mit dem aus der Nernst-Gleichung berechneten Wert.

Resultate der Na^+ -Eichung:

$$t = 56.1 \pm 5.4 \text{ mV}$$

$$K_5 = 0.4 \pm 0.1 \quad (n=8)$$

Diese Selektivität ist nur bei frisch gebauten Elektroden mit nicht zu kleinen Spitzendurchmessern ($> 2\mu$) zu erreichen.

Das Auswerte-Programm berechnet gleichzeitig die Li^+ - und Na^+ -Sprünge (konstante Ionenstärke):

$$(\Delta E)_{\text{Na}} = t_{\text{Na}} \log \frac{\frac{c_{\text{Na}}^2}{1} + K_5 \frac{c_{\text{Li}}^2}{1}}{c_{\text{Na}} + K_5 c_{\text{Li}}} \quad (56)$$

$$(\Delta E)_{\text{Li}} = t_{\text{Li}} \log \frac{\frac{c_{\text{Li}}^2}{1} + K_{150} \frac{c_{\text{Na}}^2}{1} + K_{\text{Ca}} \sqrt{c_{\text{Ca}}} \psi}{c_{\text{Li}} + K_{150} c_{\text{Na}} + K_{\text{Ca}} \sqrt{c_{\text{Ca}}} \psi}$$

Daraus erhält man die Unbekannten

$$\begin{aligned} c_{\text{Na}}^2 &= \frac{1}{K} (A - K_5 (B - K_{\text{Ca}} \sqrt{c_{\text{Ca}}} \psi)) \\ c_{\text{Li}}^2 &= \frac{1}{K} ((B - K_{\text{Ca}} \sqrt{c_{\text{Ca}}} \psi) - K_{150} A) \end{aligned} \quad (57)$$

mit

$$X = 1 - X_5 X_{150}$$

$$A = 10^{\frac{\Delta E_{Na}}{t_{Na}}} (c_{Na}^1 + X_5 c_{Li}^1) \quad (58)$$

$$B = 10^{\frac{\Delta E_{Li}}{t_{Li}}} (c_{Li}^1 + X_{150} c_{Na}^1 + X_{Ca} \sqrt{c_{Ca}})$$

Die Indizes (1,2) beziehen sich auf die Anfangs- und Endkonzentrationen.

Der Korrekturfaktor

$$\gamma = \frac{\sqrt{1000 \varphi_2}}{\varphi_1} \approx 22.4$$

berücksichtigt den unterschiedlichen Aktivitätskoeffizienten für ein- und zweiwertige Ionen.

c. TMA⁺-Elektrode

Der klassische Kalium-Ionenaustauscher (Corning Nr. 477317) mit seinem geladenen Liganden ist sehr sensitiv für große, lipophile Kationen. Der Selektivitätskoeffizient gegenüber Acetylcholin beträgt z.B. 300, d.h. die Elektrode misst ACh mehr als 2 Größenordnungen sensitiver als K⁺. Aus diesem Grunde kann man mit dem K⁺-Austauscher ISM bauen, die auch TMA⁺ (Tetramethylammonium) sehr gut messen. Wie in Tabelle 3 schon erwähnt wurde, muß man nur einen Referenzelektrolyten als "backfilling" verwenden, der TMA⁺-Ionen enthält.

Die Eichung der TMA⁺-Elektrode wurde mit Lösungen durchgeführt, die 0.1, 0.4 und 1.6 mM TMA⁺ enthielten mit jeweils 150 mM Na⁺/3.5 mM K⁺. Die Elektrodenparameter ergaben sich zu:

$$t = 56.0 \pm 1.1 \text{ mV}$$

$$X_{3.5K^+} = 0.011 \pm 0.005 \quad (n=7)$$

Die TMA⁺-Elektrode ist also gegenüber TMA⁺ etwa 100x empfindlicher als gegenüber K⁺.

Die Auswertung der Sprünge geschieht wie beim K⁺ mit Hilfe von Gleichung (53).

4. Durchführung der Messungen und Auswertung der Ergebnisse

4.1. Messungen im Agar

Die Agarversuche (3% Agar in künstlichem Liquor) wurden unternommen, weil

- Agar von der Konsistenz dem Kleinhirngewebe ähnlich ist
- alle Ionen im Agar frei diffundieren können
- deshalb eine Überprüfung der Gültigkeit der Meßmethode möglich ist.

Den Aufbau der Messung zeigt Abbildung 13.

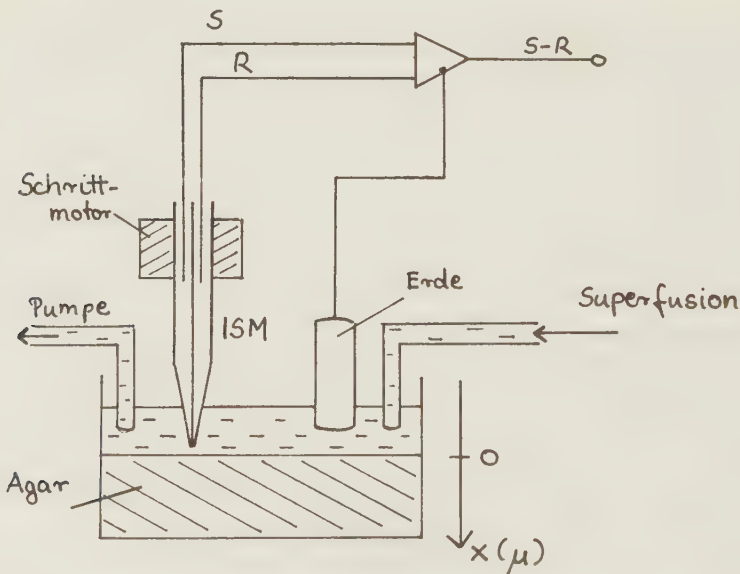


Abb.13. Messaufbau (schematisch) der Agarversuche

Zunächst wird mit Hilfe eines Mikroskops die Spitze der ISM auf die Oberfläche des Agars eingestellt ($x=0$). Der digital gesteuerte Schrittmotor gestattet die Positionierung der Elektrode senkrecht zur Oberfläche mit einer Genauigkeit von etwa 5μ (x positiv: Penetration des Agars; x negativ: Elektrode in der Superfusionsflüssigkeit). Zur Zeit $t=0$ wird die Pumpe für die Superfusion eingeschaltet. Es bildet sich eine ca. 5mm dicke Flüssigkeitsschicht über dem Agar. Beide Medien sind von der Zusammensetzung her identisch, ausgenommen das zu messende Ion ($c_{Fl}=c_e$, $c_{Agar}=c_o$). Es hat sich gezeigt, daß infolge der Diffusion von Ionen in den Agar sich innerhalb der Flüssigkeitsschicht ein Konzentrationsgradient ausbildet. Bei maximaler Durchflußrate der Pumpe (3 ml/min.) ist dieser Gradient aber nur in den ersten 100 - 200 μ der Schicht messbar.

Zu den Zeiten $t = 5, 20$ und 80 min. wird jeweils ein Tiefenprofil der Konzentration des Ions im Agar aufgenommen (die Zeiten wurden deshalb so gewählt, weil nach Gleichung (8) für ein gegebenes x das Argument von erfc umgekehrt proportional der Wurzel aus t ist). Nach Beendigung der Messung wird die Elektrode im Set mit einer normalen künstlichen Liquorlösung umspült; der Spannungssprung für den Konzentrationsgradienten c_e/c_o dient als Kontrolle der Elektrodenstabilität. Zusätzlich wird jede Elektrode vor und nach dem Versuch geeicht.

4.1.1. Auswertung der TMA^+ -Messungen

Am Beispiel des TMA^+ (Tetramethylammonium) soll gezeigt werden, wie die Auswertung der Ergebnisse Schritt für Schritt vor sich geht. Im folgenden werden dann nur noch die wichtigsten Resultate erwähnt.

Abbildung 14 zeigt ein mit einer TMA^+ -sensitiven Mikroelektrode aufgenommenes Tiefenprofil der Verteilung des Ions im Agar nach 0.4 h ($c_e=5mM$, $c_o=0$). Die Skala links gibt die absoluten TMA^+ -Konzentrationen an, die mit Hilfe der Eichfunktion der Elektrode aus den Spannungssprüngen berechnet wurden.

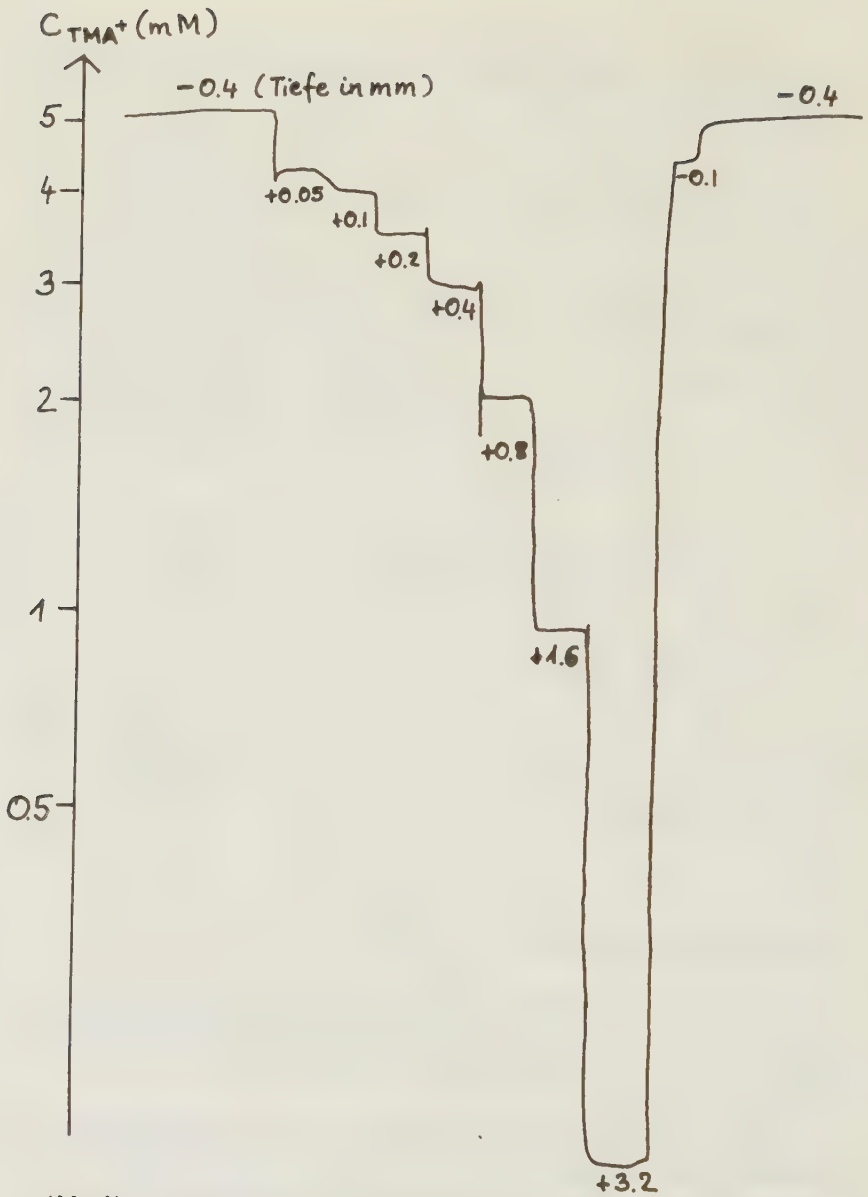


Abb. 14. Tiefenprofil im Agar nach Superfusion mit 5 mM TMA⁺ (t = 0.4 h). TMA⁺-ISM: Steigung 54 mV; Selektivität gegen K⁺ 0.01.

Der obere Teil von Abbildung 15 zeigt drei auf diese Weise erhaltene Tiefenprofile im linearen Maßstab für die Zeiten 0.15, 0.4 und 1.05 h. In der unteren Hälfte von Abbildung 15 ist nach Gleichung (8) die Größe $A = 2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c - c_0 / c_e - c_0)$ gegen x aufgetragen. Wie nach der Theorie der reinen Diffusion zu erwarten ist (vergleiche 2.5.), ergibt sich in allen drei Fällen eine Gerade, wobei diese Geraden gleiche Steigungen haben. Daraus läßt sich die Diffusionskonstante zu $D = 6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmen. Die durchgezogenen Kurven in Abbildung 15a sind die mit dieser Konstanten theoretisch berechneten Diffusionskurven. Man sieht, daß sie recht gut zu den gemessenen Werten passen.

Trotz der relativ hohen Durchflußgeschwindigkeit des Superfusionsystems (3 ml/min) bildete sich im Bereich zwischen der Agaroberfläche und den benachbarten 250 bis 400 μ ein TMA^+ -Konzentrationsgradient aus. Deshalb gehen die Diffusionskurven in Abbildung 15a bzw. die Geraden in Abbildung 15b nicht durch den Nullpunkt ($x=0$, $c=c_e$ bzw. $A=0$).

Aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ergab sich die Diffusionskonstante von TMA^+ in Agar (bei Zimmertemperatur) zu

$$D = (7.2 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (n=3)$$

4.1.2. Auswertung der K^+ -Messungen

In gleicher Weise wie beim TMA^+ wurden K^+ -Tiefenprofile in Agar aufgenommen. Die Anfangskonzentration im Agar (c_0) wurde zu 3.8 mM bestimmt. In der Superfusionsflüssigkeit waren 12 mM oder 24 mM KCl ($\hat{=} c_e$). Der Zusammenhang zwischen $2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c - c_0 / c_e - c_0)$ und x ist wie beim TMA^+ linear. Aus den Steigungen der Geraden ergab sich die Diffusionskonstante von K^+ in Agar in drei Experimenten zu

$$D = (12.2 \pm 0.6) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (n=3)$$

(Zimmertemperatur)

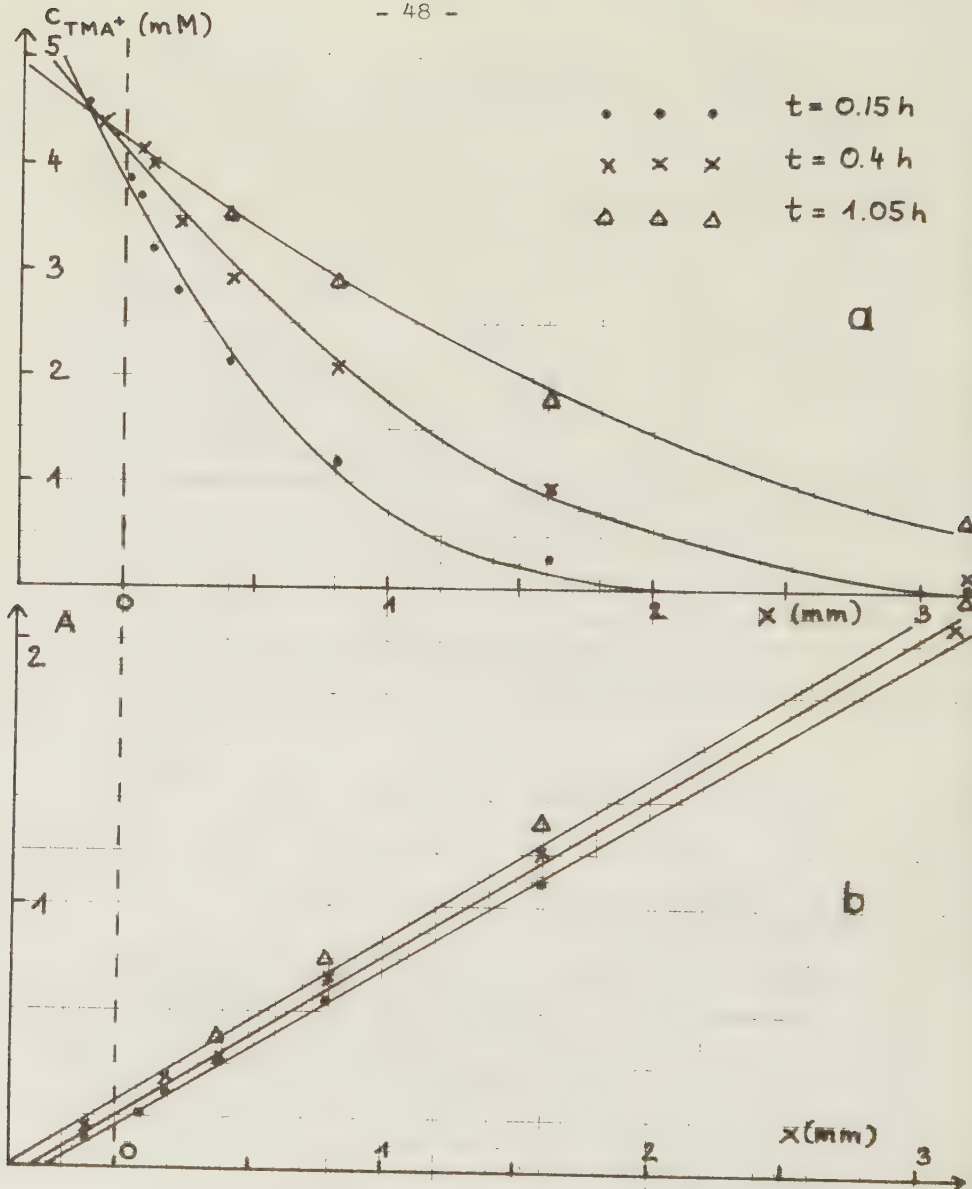


Abb.15. (a) TMA^+ -Tiefenprofil in Agar zu drei verschiedenen Zeiten. Die durchgezogenen Kurven wurden mit Hilfe von $D=6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ berechnet.

(b) $A=2\sqrt{t'} \operatorname{erfc}^{-1}(c-c_0/c_e-c_0)$ gegen x aufgetragen. Die Steigung der Geraden entspricht $1/\sqrt{D'}$.

4.1.3. Auswertung der Li^+ -Messungen

Die Li^+ -Messung in Gegenwart von 150 mM NaCl mit Hilfe ionensensitiver Mikroelektroden wird von Autoren bezweifelt (siehe z.B. Zitat (39)). In dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, daß eine eindeutige, gleichzeitige Bestimmung von Li^+ und Na^+ im extrazellulären Milieu mit Hilfe von Tripelelektroden möglich ist.

Abbildung 16 zeigt ein solches Experiment im Agar. Um die Osmolarität und die Ionenstärke möglichst konstant zu halten, wurde in der Superfusionsflüssigkeit Na^+ gegen Li^+ ausgetauscht. Die Anfangskonzentrationen im Agar waren: Li^+ 0 mM, Na^+ 160 mM. Die gemessenen Tiefenprofile lassen für die beiden Ionen einander entgegengesetzte Konzentrationsgradienten erkennen.

In Abbildung 17 ist noch einmal die Bestimmung der Diffusionskonstanten vorgeführt. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich $D = 8.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$; die durchgezogenen Kurven in der oberen Bildhälfte sind mit diesem Wert berechnet worden.

Der Mittelwert für die Diffusionskonstante von Li^+ in Agar ergibt

$$D = (8.9 \pm 1.0) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (n=7)$$

4.1.4. Vergleich der Agar-Experimente mit Diffusionsmessungen in wäßriger Lösung

Im Agar können die in dieser Arbeit untersuchten Ionen frei diffundieren. Die Agar-Experimente dienen deshalb als Standard für die Messungen im Kleinhirn sowie als Test für die Brauchbarkeit der in dieser Arbeit angewandten Methode. Im nächsten Abschnitt wird gezeigt, wie sich im Kleinhirn gegenüber dem Agar-Gel

- a) die Diffusionskonstanten D verändern
- b) die Diffusionskinetik beeinflußt wird

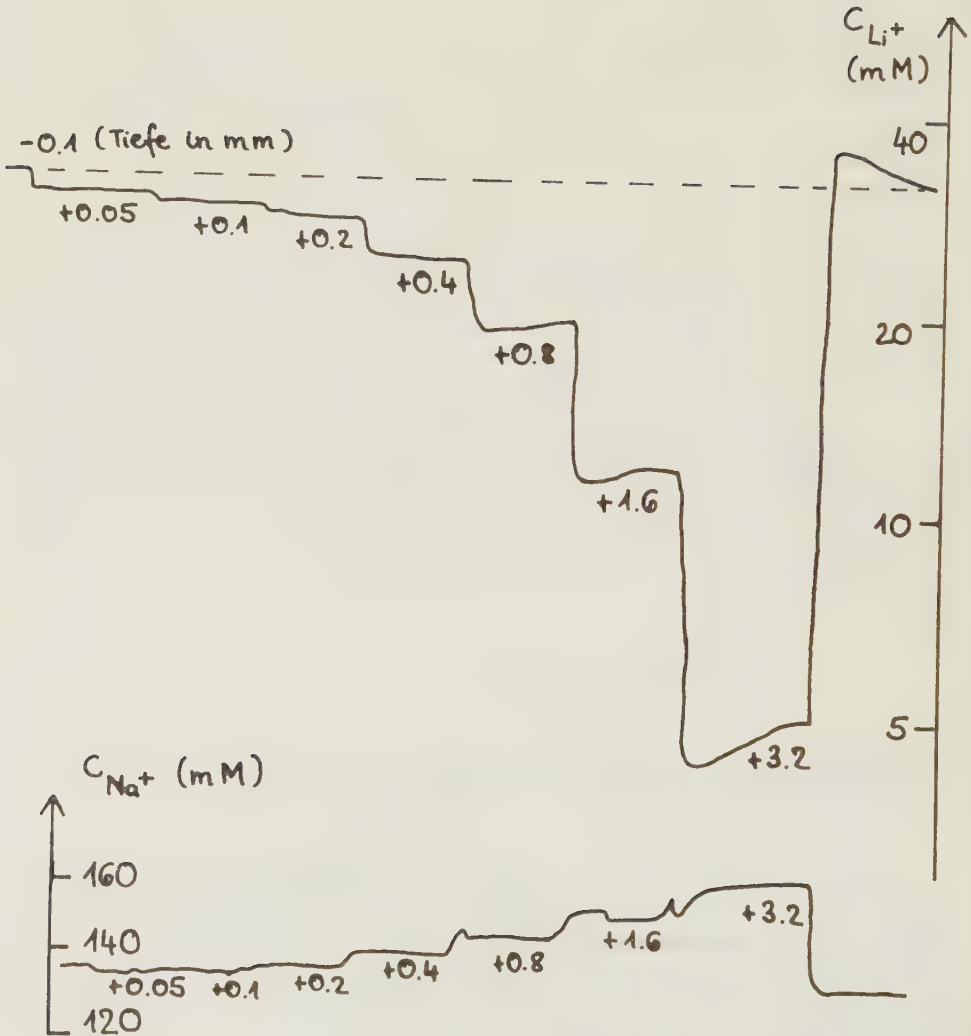


Abb.16. Tiefenprofil im Agar nach Superfusion mit 30 mM Li^+ /130 mM Na^+ ($t=1.05$ h).

Li^+ -ISM: Steigung 61 mV, Selektivität 0.042

Na^+ -ISM: Steigung 62 mV, Selektivität 0.4

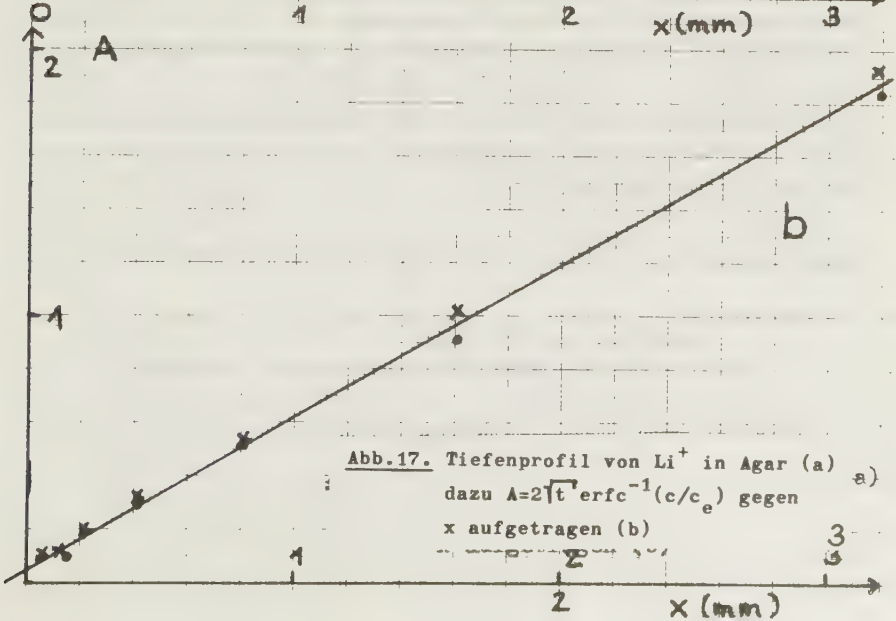
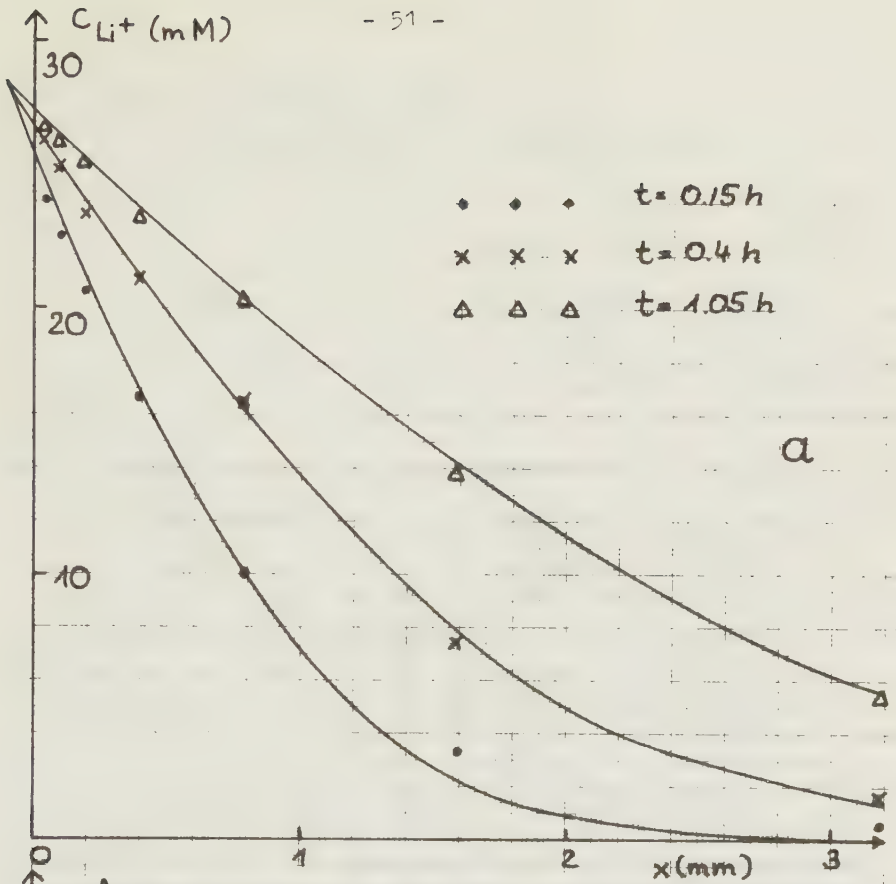


Abb. 17. Tiefenprofil von Li^+ in Agar (a) dazu $A = 2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c/c_e)$ gegen x aufgetragen (b)

	wäßrige Lösung	3% Agar (diese Arbeit)	0.3% Agar (Zitat (36))
TMA ⁺	11.4 ^a	7.2 ± 0.5	11.1 ± 1.0
K ⁺	19.2 ^b	12.2 ± 0.6	-
Li ⁺	13.1 ^b	8.9 ± 1.0	-

Tabelle 12. Diffusionskonstanten in Agar und wäßriger Lösung

^a Zitat (24)

^b Zitat (19)

(D in 10⁻⁶ cm²/s)

In Tabelle 12 sind die in dieser Arbeit ermittelten Diffusionskonstanten mit Tabellenwerten in wäßriger Lösung verglichen. Die Agarwerte sind durchweg kleiner und es gilt näherungsweise

$$D_{H_2O}/D_{Agar} \sim 1.5 \quad (= \lambda^2)$$

Der Grund für diesen Unterschied dürfte darin bestehen, daß das Polysaccharid-Gel des 3%-igen Agars für die freie Diffusion der Ionen ein Hindernis darstellt. Daraus läßt sich eine "Tortuosität" dieses Agars zu $\lambda \sim 1.2$ bestimmen. In zehnfach verdünntem Agar (siehe Zitat (36)) ist die Diffusionskonstante in Agar und wäßriger Lösung dagegen gleich (dritte Spalte von Tabelle 12).

4.2. Messungen im Kleinhirncortex

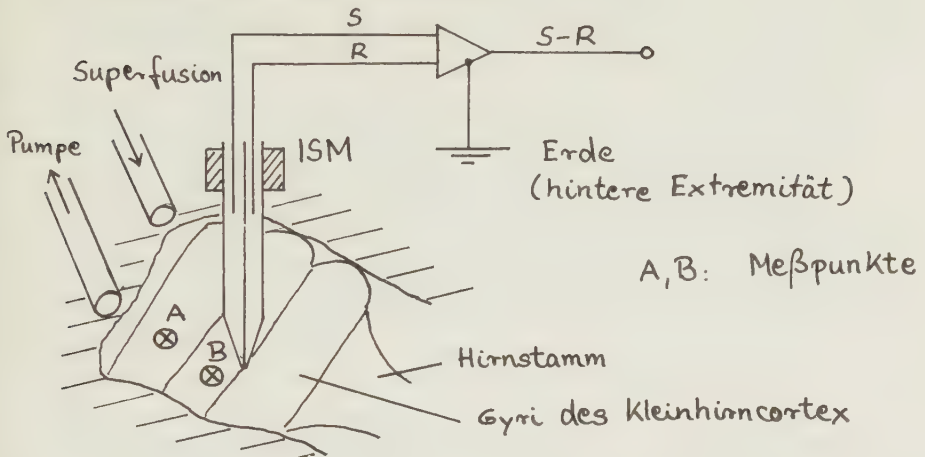


Abb.18. Messaufbau (schematisch) der Kleinhirnversuche

Den Aufbau der Messungen im Kleinhirncortex zeigt die Abbildung 18. Die Versuchstiere (männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250g/ Normaldiät der Firma Altromin) werden zunächst mit Urethan narkotisiert (Dosis ca. 2-3 g/kg). Nach Eintritt der Narkosewirkung wird ein Teil des Hinterhauptbeines entfernt, und die drei am weitesten kaudal gelegenen Windungen des Kleinhirns werden freigelegt. Die Dura mater wird gespalten und aufgeklappt. Die Arachnoidea wird entfernt, so weit sich dies ohne Verletzung des Kleinhirngewebes bewerkstelligen läßt. Anschließend wird der freigelegte Hirnteil mit einer ange-wärmten Flüssigkeit superfundiert, die zunächst die Zusammen-setzung des künstlichen Liquors hat. Diese Lösung dient folgen-den Zwecken:

- Schutz des Kleinhirncortex vor Austrocknung
- Stabilisierung der Temperatur auf ca. 37° C.
- Referenzflüssigkeit für die Messung von Ionenkonzentra-tionen im cerebellaren Cortex (c_o)
- Vehikel für die Superfusion der KH-Oberfläche mit einer Außenlösung bekannter Konzentration (c_e)

Die Superfusionsflüssigkeit wird ständig mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O_2 / 5% CO_2) durchperlt, um die C_2 -Versorgung und den pH des Hirngewebes konstant zu halten (pH der Flüssigkeit = 7.4).

Als erstes wird an mehreren Stellen des Kleinhirns die Ausgangskonzentration des interessierenden Ions (c_o) gemessen und ein Tiefenprofil aufgenommen. Dabei wird die ISM so einjustiert, daß sie senkrecht zur Oberfläche des Gyrus steht und etwa in der Mitte des Gyrus penetriert (siehe Abbildung 19). Damit werden falsche Tiefenangaben im Cortex so weit wie möglich vermieden. Bei keiner Messung fand sich ein Hinweis darauf, daß die Tiefenangaben des Schrittmotors nicht stimmten, obwohl dies auf Grund anatomischer Unterschiede der KH-Windungen durchaus möglich erscheint (z.B. ein plötzlicher Konzentrationsanstieg bei großen x-Werten als Zeichen des schrägen "Durchstechens" eines Gyrus). Der Nullpunkt, d.h. die Oberfläche des Cortex, wird unter Sicht mit dem Operationsmikroskop (Firma Leitz), sowie unter Berücksichtigung der Elektrodenantwort beim Berühren der Oberfläche mit der Spitze eingestellt. (Darunter versteht man einen kurzen, reversiblen Ausschlag des Referenzkanals). Ist das zu messende Ion anfangs im KH nicht vorhanden ($c_o=0$), gibt die Messung des Tiefenprofils Klarheit über mögliche Fehlfunktionen der ISM.

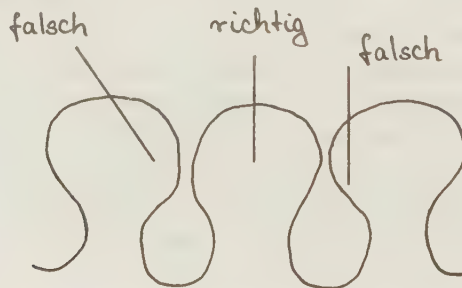


Abb.19. Schematischer Querschnitt durch die Kleinhirnrinde beim Einstechen der Elektrode

Zu Beginn der eigentlichen Messung ($t=0$) wird dann die Konzentration c_e des interessierenden Ions in die Superfusionsflüssigkeit gegeben (bzw. die Flüssigkeiten werden ausgetauscht). Wie im Agar wird nach 5, 20 und 80 Minuten ein Tiefenprofil im cerebellaren Cortex aufgenommen. Am Ende des Versuchs wird die Elektrode mit dem ursprünglichen künstlichen Liquor umspült. Vor und nach dem Versuch werden alle Elektroden geeicht.

Da sich die Ionen, die in das Kleinhirn eindiffundiert sind, nur sehr schwer durch Auswaschen wieder entfernen lassen, wurde an jeder Ratte nur eine Konzentration c_e ausprobiert. Nach Versuchsende wurden die Tiere durch Durchtrennung des Hirnstamms getötet.

4.2.1. Auswertung der TMA^+ -Messungen

Das TMA^+ -Ion bleibt wie das TEA^+ - (Tetraäthylammonium)Ion für kurze Superfusionszeiten im extrazellulären Raum (Zitat (36)). Deshalb werden diese Ionen als Marker des extrazellulären Raumes verwendet (5). Aus diesem Grund wird auch das TMA^+ in dieser Arbeit untersucht: als Ion, das hauptsächlich durch freie Diffusion im ECS in das Kleinhirn eindringt und nur in geringem Maße von den Zellen aufgenommen wird. Für längere Superfusionszeiten muß diese Annahme modifiziert werden, wie im folgenden zu sehen sein wird.

Abbildung 20 gibt ein gemessenes TMA^+ -Tiefenprofil im KH-Cortex der Ratte wieder. Die zu diesem Experiment gehörenden Diffusionskurven sind in Abbildung 21a gezeigt. Trägt man nun den Faktor $A=2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c/c_e)$ gegen x auf, erhält man für kurze ($t=0.15h$) und lange ($t=1.1h$) Superfusionszeiten zwei Geraden mit etwas unterschiedlichen Steigungen (siehe Abbildung 21b). Die dazugehörigen Diffusionskonstanten sind

$$D(t=0.15h) = 2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$D(t=1.1h) = 2.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Diese Änderung von D läßt vermuten, daß TMA^+ für große Zeiten von den Zellen aufgenommen wird. Abbildung 22a zeigt, daß sich ein linearer Zusammenhang ergibt, wenn man $\ln(c/c_e)$ gegen x

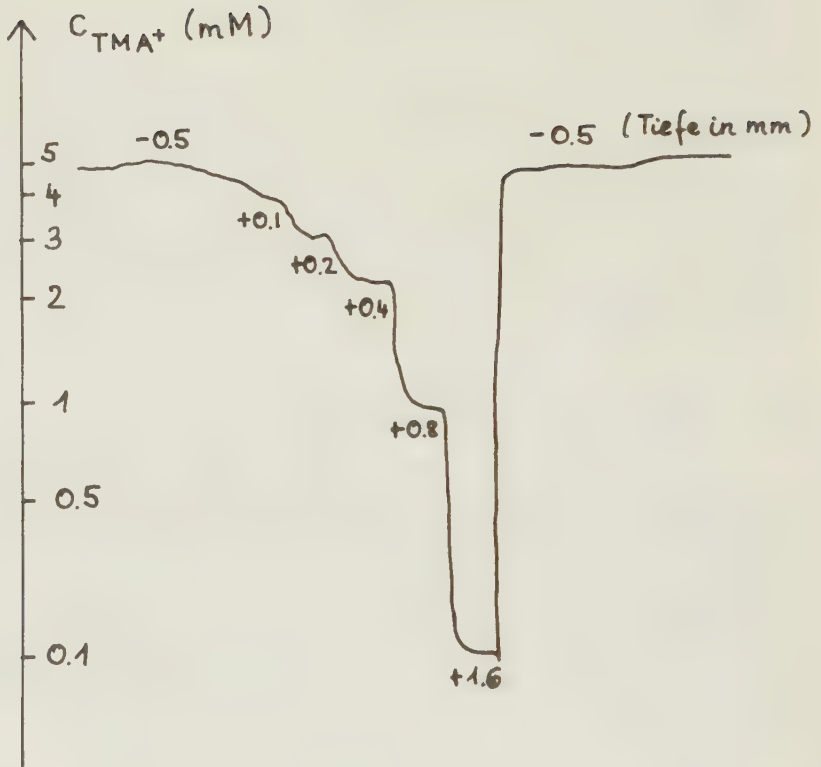


Abb.20. Tiefenprofil im Kleinhirn nach Superfusion
mit 5 mM TMA⁺ ($t=0.15h$)
TMA⁺-ISM: Steigung 55 mV, Selektivität 0.02

aufträgt (vergleiche Abbildung 8). Zum Vergleich ist darunter (Abbildung 22b) dieselbe Funktion für ein Agar-Experiment gezeigt. In diesem Fall ist die Funktion nicht linear, sondern gekrümmt, wie nach Abbildung 8 zu erwarten ist.

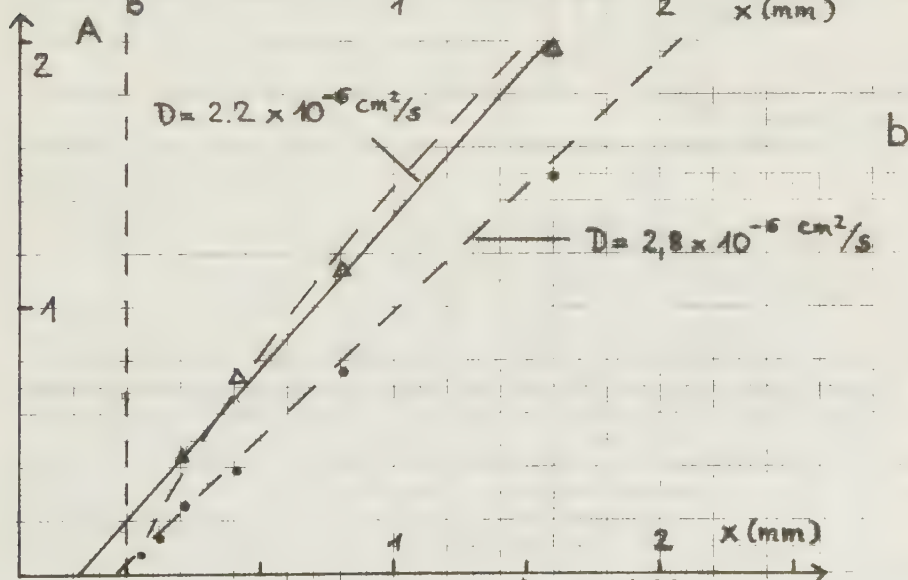
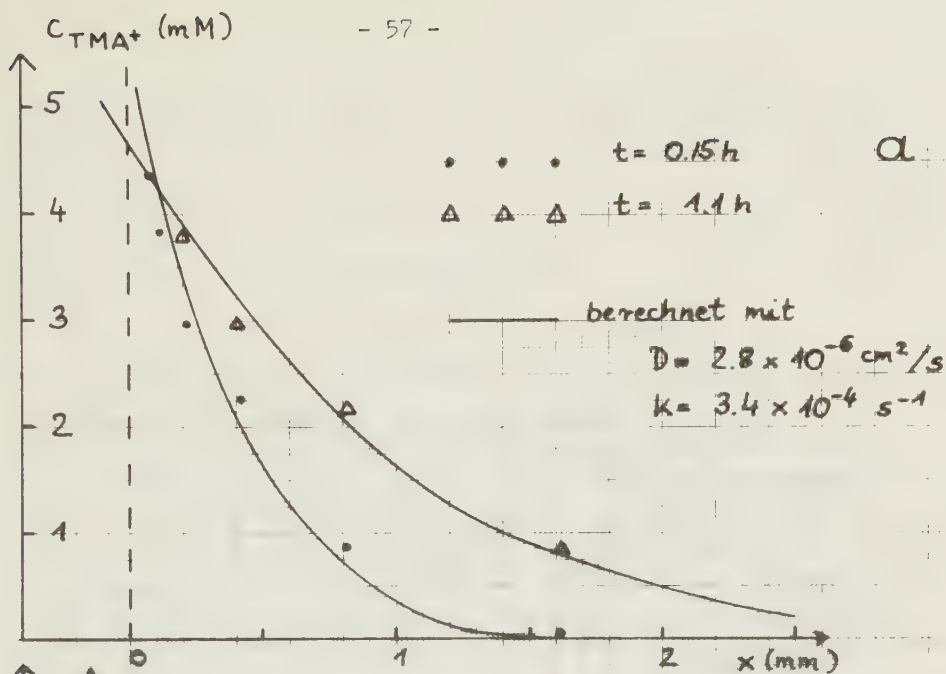


Abb. 21. (a) Tiefenprofil von TMA⁺ im Kleinhirn
 (b) dazu $A = 2\sqrt{t} \operatorname{erfc}^{-1}(c/c_0)$ gegen x aufgetragen.
 Erläuterungen siehe im Text.

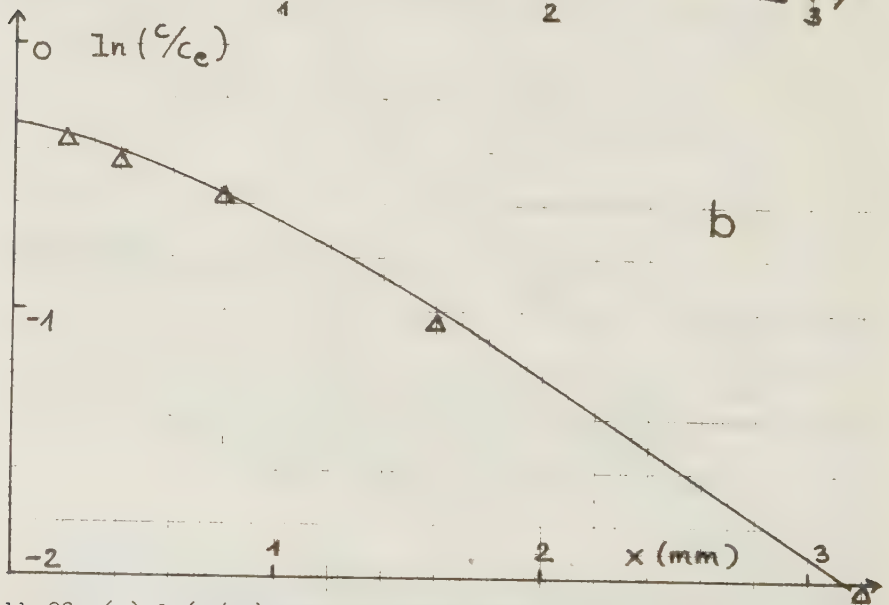
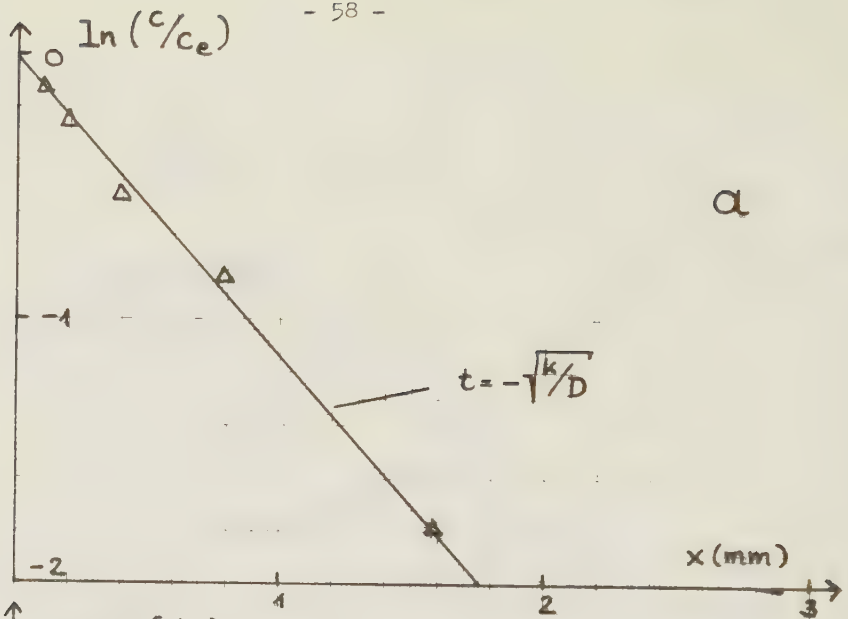


Abb.22. (a) $\ln(c/c_e)$ gegen x aufgetragen für ein TMA^- -Tiefenprofil im Kleinhirn

(b) dasselbe für ein TMA^+ -Tiefenprofil im Agar

Aus der Steigung der Geraden in Abb. 22a erhält man (mit $D=2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) die Konstante k für die Aufnahme nach intrazellulär zu

$$k = 3.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Daraus ergibt sich eine Transferrate von

$$f_1 = k \cdot V_1 = 0.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} (\hat{=} 0.25 \text{ h}^{-1})$$

Eine Modellrechnung analog Abbildung 7 mit diesen Werten ergibt die in Abbildung 21b gestrichelt eingezeichneten Kurven, die recht gut mit den Meßpunkten übereinstimmen. Dieses Ergebnis sollte jedoch mit der nötigen Vorsicht zur Kenntnis genommen werden, wie in Abschnitt 2.5.b erklärt wurde. Im nächsten Kapitel wird die Gültigkeit der so berechneten Transferkonstante im Vergleich mit den Messungen anderer Autoren diskutiert.

Aus mehreren Experimenten mit verschiedenen Versuchstieren ergab sich eine Diffusionskonstante von TMA^+ im Kleinhirn (bei 37° C) zu

$$D = (2.8 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (n=3)$$

Daraus erhält man mit Hilfe von Gleichung (15) die Tortuosität des Kleinhirns für TMA^+

$$\text{relativ zum Agar} \quad \lambda = \sqrt{D_{\text{Agar}}/D_{\text{KH}}} = 1.60$$

$$\text{relativ zu H}_2\text{O} \quad \lambda = \sqrt{D_{\text{H}_2\text{O}}/D_{\text{KH}}} = 2.02$$

Es ist hier noch nachzutragen, daß bei dem gezeigten Experiment die Arachnoidea über der Ableitstelle entfernt worden war. Deshalb ist hier nichts von einer Oberflächenbarriere zu sehen. Bei intakter Arachnoidea wurden Barrierenkonstanten zwischen 0.5 und 2 mm^{-1} gemessen. Über die Methodik dieser Messungen wird im Abschnitt über Li^+ ausführlich berichtet.

4.2.2. Auswertung der Li^+ -Messungen

Die Abbildung 23 zeigt ein im Kleinhirncortex aufgenommenes Li^+ -Tiefenprofil bei Superfusion mit 23.5 mM Li^+ . Zwei Unterschiede zu den vorhergehenden Abbildungen fallen auf den ersten Blick auf (vergleiche z.B. Abbildung 20):

- das Signal-Rausch-Verhältnis ist schlechter geworden. Ein Grund dafür könnte der in diesem Experiment hohe Elektrodenwiderstand sein.
- vom Ringer auf eine Tiefe von 0.05 mm im Kleinhirncortex ist ein großer Sprung in der Konzentration festzustellen: von ca. 24 mM auf ca. 18 mM. Dies beruht auf einer Oberflächenbarriere für Li^+ -Ionen. Das morphologische Substrat dieser Barriere dürfte die Arachnoidea darstellen, vielleicht auch noch die Pia mater. In einer Reihe von Experimenten war zu sehen, daß die Barriere sehr viel kleiner wurde oder ganz verschwand, wenn die Arachnoidea über der Ableitstelle entfernt wurde.

Für die theoretische Behandlung der Diffusion folgt daraus, daß jetzt die Gleichung (12) zuständig ist. Leider ist damit auch die Gleichung (8) nicht mehr anwendbar, d.h. die Diffusionskurven lassen sich nicht mehr linearisieren. Die Bestimmung der Diffusions- und der Barrierenkonstante geschieht jetzt mit Hilfe eines iterativen Verfahrens:

- (1) Zunächst wird aus dem Konzentrationssprung an der Stelle $x=0$ nach Gleichung (14) die Barrierenkonstante h ausgerechnet. Dabei wird für D ein vernünftiger Schätzwert eingesetzt.
- (2) Dann wird bei vorgegebenem h in der Diffusionsgleichung (12) D so lange variiert, bis das gemessene c mit dem berechneten c übereinstimmt. Diese Rechnung muß für jeden Meßpunkt extra ausgeführt werden.
- (3) Aus den so erhaltenen Werten für D wird der Mittelwert gebildet.
- (4) Dieser Mittelwert wird in Schritt (1) eingesetzt und wieder ein h ausgerechnet.
- (5) Die Prozedur wiederholt sich jetzt. Sie wird so lange fortgesetzt, bis sich D und h nicht mehr ändern.

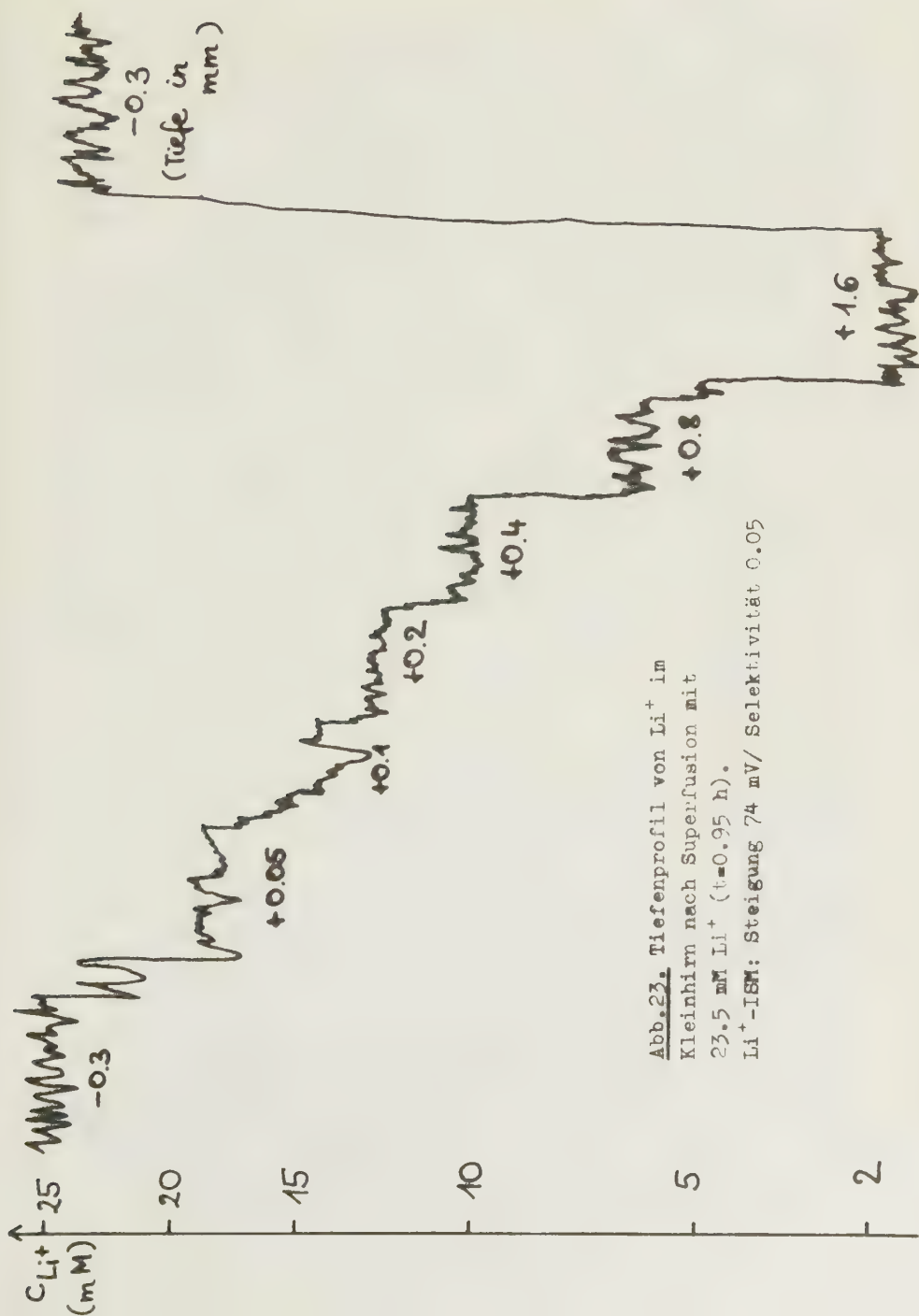
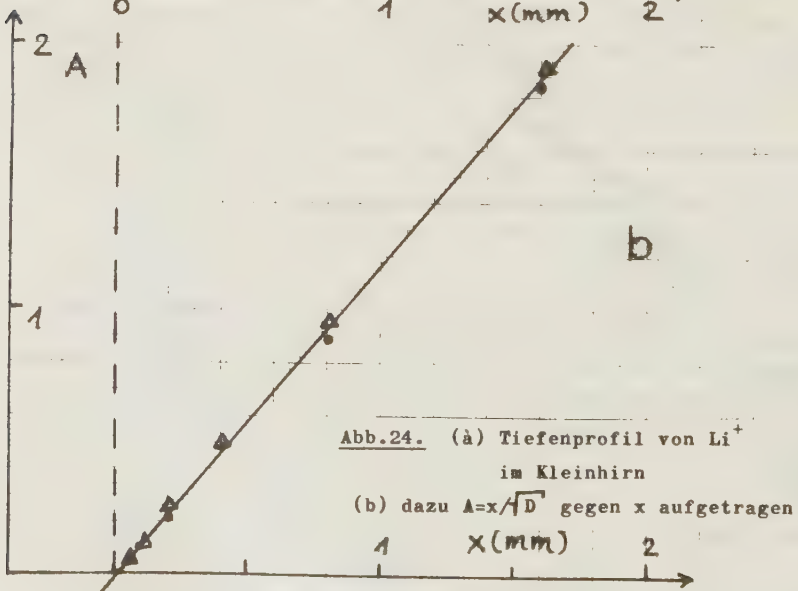
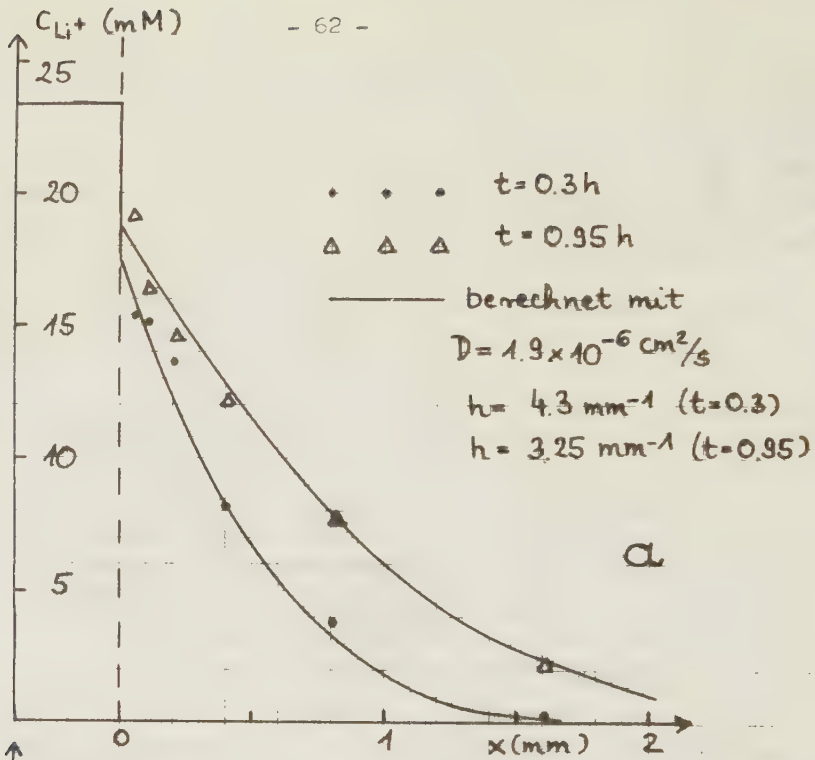


Abb. 23. Tiefenprofil von Li^+ im
Kleinhirn nach Superfusion mit
 23.5 mM Li^+ ($t=0.95 \text{ h}$).
 Li^+ -ISM: Steigung $74 \text{ mV/Selektivität } 0.05$



In Abbildung 24 ist das Ergebnis eines Diffusionsexperiments gezeigt (dazu gehört auch Abbildung 23). In der unteren Bildhälfte ist dabei die Zahl $A=x/\sqrt{D}$ für die verschiedenen Einzelmessungen gegen x aufgetragen. Dadurch kann man die Fehlerbreite der Bestimmung der Diffusionskonstanten mit früheren Abbildungen vergleichen (Abbildungen 15, 17, 21). Im Gegensatz zu diesen Bildern ist aber hier D nicht aus der Steigung bestimmt worden.

In der oberen Bildhälfte ist das theoretische Diffusionsprofil gezeigt, welches mit Hilfe der Konstanten $D=1.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $h=4.3$ bzw. 3.25 mm^{-1} berechnet wurde. Diese Kurven passen recht gut zu den Meßpunkten. Die Barrierenkonstante war für ein Versuchstier meist keine "Konstante", sondern variierte je nach dem Ort des Einstichs.

Es interessiert natürlich, ob Li^+ -Ionen von den Zellen aufgenommen werden. In Abbildung 24 sieht man, daß sich für kurze ($t=0.3\text{h}$) und lange Zeiten ($t=0.95\text{h}$) dieselben Geraden ergeben. Nach Abbildung 7 müsste sich ein Einstrom von Li^+ -Ionen mit einer Transferkonstante von $f=1.5 \text{ h}^{-1}$ durch eine Änderung der Steigung der Geraden verraten. Daraus läßt sich eine (grobe) Abschätzung angeben:

- die Aufnahmekonstante k von Li^+ nach intrazellulär ist kleiner als

$$1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Das entspricht einer Transferrate $f_1=kV_1$

$$< 2.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} (\hat{=} 1.0 \text{ h}^{-1})$$

- die Li^+ -Diffusion im Kleinhirn ist demnach für die in dieser Arbeit vorkommenden Superfusionszeiten ($t < 1.5\text{h}$) von einer freien Diffusion im extrazellulären Kompartiment nicht zu unterscheiden.
- die "steady-state"-Lösung sollte nicht angewandt werden (zur Begründung siehe Abschnitt 2.5.b)

Aus verschiedenen Experimenten ergibt sich für die Li^+ -Diffusionskonstante im Kleinhirn zu

$$D = (1.9 \pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (n=5)$$

(bei 37° C)

Die Tortuosität des Kleinhirns für Li^+ -Ionen beträgt

relativ zum Agar $\lambda = 2.16$

relativ zu H_2O $\lambda = 2.62$

Für die mittlere Barrierenkonstante wurde

$$h = 4 \pm 0.8 \text{ mm}^{-1} \quad (n=4)$$

erhalten.

4.2.3. Auswertung der K^+ -Messungen

Vor Beginn der K^+ -Superfusionen wurde bei allen Versuchstieren die K^+ -Baseline (c_o) in verschiedenen Tiefen bestimmt. Als Mittelwert dieser Messungen ergab sich

$c_o = [\text{K}^+]_o$	$= 3.6 \pm 0.2 \text{ mM}$	für $x = 0.1 \text{ mm}$
	$3.7 \pm 0.2 \text{ mM}$	für $x = 0.2 \text{ mm}$
	$3.8 \pm 0.2 \text{ mM}$	für $x = 0.4 \text{ mm}$
	$4.0 \pm 0.2 \text{ mM}$	für $x \geq 0.8 \text{ mm}$ (n=7)

Es ist also ein leichter Anstieg der K^+ -Baseline mit der Tiefe festzustellen. Dieser K^+ -Anstieg ist möglicherweise durch den Einstich der Elektrode und den dadurch verursachten mechanischen Schaden am Kleinhirngewebe verursacht worden.

Für die Diffusionsexperimente kamen nur bestimmte K^+ -Konzentrationen in Frage. Superfusionslösungen mit $c_e > 15 \text{ mM}$ führten zu einem wesentlichen Anstieg der Spontanaktivität der Neurone, was zu Störungen der K^+ -Messung führte. Andererseits waren Lösungen mit $c_e < 10 \text{ mM}$ ungeeignet, da sich keine vernünftigen Konzentrationsunterschiede messen liessen.

Abbildung 25 zeigt in der oberen Hälfte gemessene Tiefenprofile während eines Superfusionsexperiments. Zwei Tatsachen fallen auf den ersten Blick auf:

- es existiert eine Oberflächenbarriere für K^+ -Ionen
- die Diffusionskurven sind "flacher" als bei allen vorhergehenden Beispielen. Mit anderen Worten: die K^+ -Gradienten sind auch in den tiefen Regionen des Kleinhirncortex nur schwach ausgeprägt.

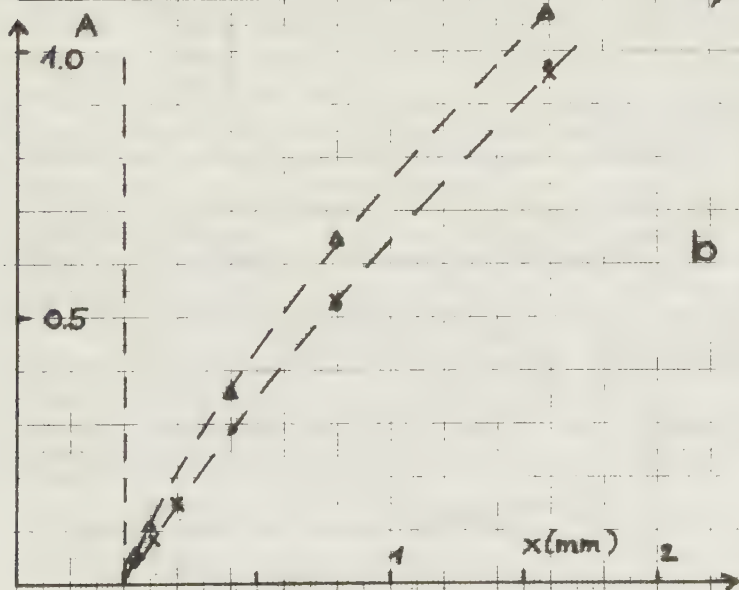
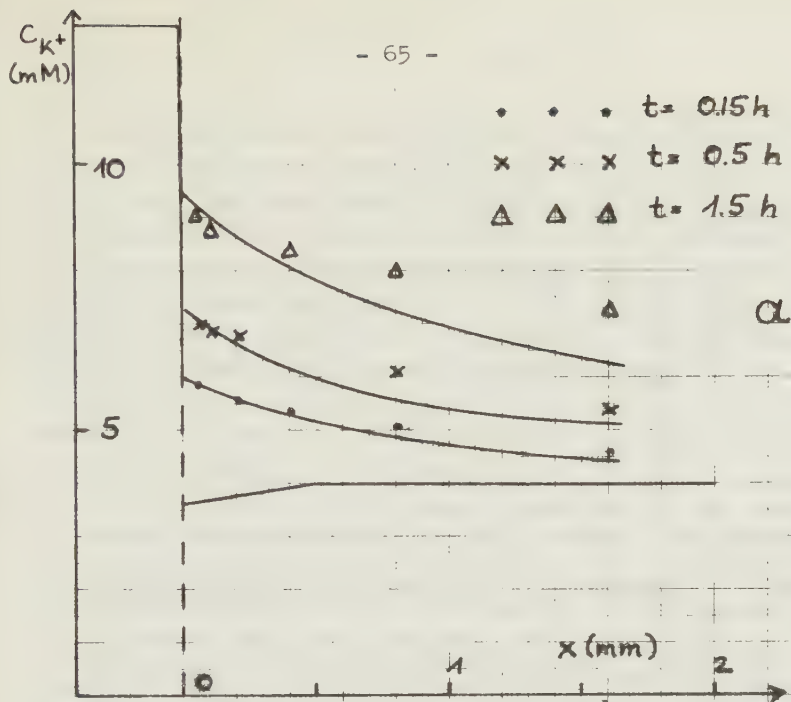


Abb. 25. (a) Tiefenprofil von K^+ im Kleinhirn
(b) dazu $A = x/\sqrt{D}$ gegen x aufgetragen

Die dazu gehörenden "linearisierten" Kurven (d.h. $x/\sqrt{D}$ gegen x aufgetragen) sind im unteren Teil von Abbildung 25 gezeigt. Die Diffusionskonstanten D wurden mit Hilfe des Verfahrens berechnet, das im Abschnitt über die Li^+ -Messungen (4.2.2.) erklärt wurde. Diese Kurven in Abbildung 25b sind gekrümmt; es ergeben sich außerdem verschiedene Kurven für kleine und große Superfusionszeiten (d.h. D ist zeitabhängig und tiefenabhängig). Nach dem Drei-Kompartiment-Modell, das in Abschnitt 2.4. erklärt wurde, wäre eine ähnliche Variation der Diffusionskonstanten zu erwarten, wenn K^+ -Ionen von den Zellen aufgenommen würden (durch passiven Einstrom oder aktives Pumpen). Was dazu nicht paßt, ist die Tatsache, daß D auch für kurze Zeiten ($t=0.15\text{h}$) tiefenabhängig ist. Die K^+ -Konzentration in der Tiefe ($x=0.8$ und 1.6 mm) ist größer, als nach dem Modell zu erwarten wäre. Deshalb stimmen die mit einem festen D berechneten Diffusionsprofile in Abbildung 25a nicht mit den Messungen überein. Im nächsten Kapitel wird diskutiert, inwiefern der "spatial-buffer"-Mechanismus beim K^+ für diese Ergebnisse verantwortlich ist.

In Abbildung 25a wurde eingesetzt:

für $t=0.15\text{h}$:	$D = 4.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	$h = 0.65 \text{ mm}^{-1}$
für $t=0.5\text{h}$:	$D = 4.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	$h = 0.63 \text{ mm}^{-1}$
für $t=1.5\text{h}$:	$D = 3.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	$h = 0.97 \text{ mm}^{-1}$

Man kann für jedes Versuchstier aus den ersten D -Werten den Mittelwert bilden (für $x=0.05, 0.1, 0.2$ und 0.4 mm) und erhält dann für jedes Experiment eine Diffusionskonstante für kurze und eine für lange Superfusionszeiten.

$t < 0.5\text{h}$:	$D = (4.1 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	($n=6$)
$t > 1.0\text{h}$:	$D = (2.8 \pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$	($n=4$)

Für K^+ -Ionen ergibt sich daraus für die Tortuosität

$t < 0.5\text{h}$:	$\lambda(\text{relativ zum Agar}) = 1.72$
	$\lambda(\text{relativ zu H}_2\text{O}) = 2.16$
$t > 1.0\text{h}$:	$\lambda(\text{relativ zum Agar}) = 2.09$
	$\lambda(\text{relativ zu H}_2\text{O}) = 2.62$

Die gemessenen Barrierenkonstanten hängen von der Einstichstelle ab. Die Unterschiede sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß am Ableitpunkt A (siehe Abbildung 18) die Arachnoidea dem Kleinhirn noch relativ eng anliegt, während an der Stelle B sich die Cisterna cerebello-medullaris vorzuwölben beginnt. Da beim Präparieren über dem Hirnstamm ein Loch in die Arachnoidea gemacht werden muß, ist dann das Diffusionshindernis für die K^+ -Ionen leichter zu umgehen.

$$\text{Stelle A:} \quad h = 0.9 \pm 0.4 \text{ mm}^{-1} \quad (n=6)$$

$$\text{Stelle B:} \quad h = 2.6 \pm 0.6 \text{ mm}^{-1} \quad (n=8)$$

4.2.4. K^+ -Messungen nach Applikation von Ouabain

Digitalisglykoside wie z.B. Ouabain sind spezifische Inhibitoren der Na^+K^+ -Pumpe (Zitat (50)). Um zu überprüfen, welchen Beitrag aktive Pumpprozesse zur Verteilung des K^+ im Extrazellulärraum liefern, wurde bei 2 Versuchstieren für längere Zeit eine Ouabainkonzentration von 10^{-5} M in der Superfusionsflüssigkeit appliziert. Nach einem raschen Anstieg des $[K^+]_o$ von 3.6 mM auf 5.7 mM erreicht die K^+ -Baseline nach ca. 20 min. einen konstanten Wert von ca. 4.8 mM. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Experimenten (Zitat (58)).

Abbildung 26a zeigt ein solches unter Ouabain aufgenommenes Tiefenprofil. Es fällt sofort auf, daß im Vergleich zu Abbildung 25a die Diffusionskurven steiler sind. Die Auftragung der Diffusionskonstanten als $x/\sqrt{D}$ gegen x im unteren Teil der Abbildung zeigt, daß die Steigung sehr viel geringer geworden ist. Außerdem ist D jetzt nur mehr zeit- aber nicht mehr tiefenabhängig. Die Mittelwerte aus beiden Experimenten ergeben:

$$\text{für } t < 0.5h: \quad D = (6.5 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/s$$

$$\text{für } t > 1.0h: \quad D = (5.3 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/s$$

Für die Tortuosität ergibt sich jetzt

t 0.5h:	(relativ zum Agar) = 1.37
	(relativ zu H ₂ O) = 1.72
t 1.0h:	(relativ zum Agar) = 1.52
	(relativ zu H ₂ O) = 1.90

Die mit diesen D-Werten und den gemessenen Barrierenkonstanten berechneten theoretischen Diffusionskurven in Abbildung 26a geben die Messung recht gut wieder, im Gegensatz zu Abbildung 25a.

Schon aus diesen Experimenten läßt sich schließen, daß Ouabain den K⁺-Transport im Kleinhirn beeinflußt. Welche Folgerungen sich daraus für die Transportmechanismen ziehen lassen, wird im nächsten Kapitel diskutiert werden.

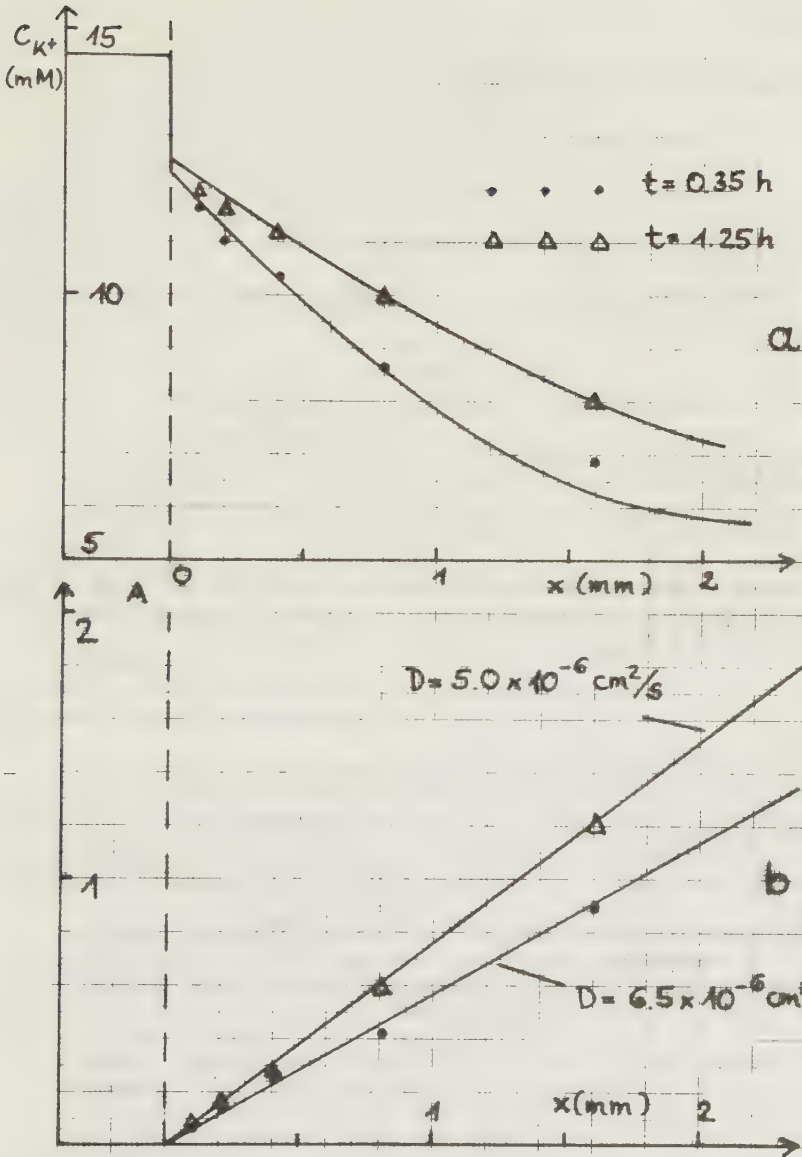


Abb.26. (a) Tiefenprofil von K^+ im Kleinhirn nach Applikation von 10^{-5} M Ouabain
(b) dazu $A = x/\sqrt{D}$ gegen x aufgetragen

5. Diskussion

5.1. Tetramethylammonium (TMA^+)

Die Diffusion des TMA^+ -Ions im Kleinhirn der Ratte wurde von Nicholson und Phillips (36) untersucht. Sie applizierten Iontophorese-Pulse von 50 Sekunden Dauer und variabler Stromstärke. Aus ihren Messungen ergab sich:

$$\text{Diffusionskonstante im Kleinhirn } D = (5.0 \pm 1.0) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$\text{Tortuosität } \lambda = 1.49 \pm 0.05$$

$$\text{Uptake-Konstante } k = (8.6 \pm 1.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$(\text{entspricht } f_1 = 0.63 \text{ h}^{-1})$$

Diese Werte unterscheiden sich deutlich von den in dieser Arbeit gemessenen (siehe Abschnitt 4.2.1.). Die Diffusionskonstante im Kleinhirn ist dort mit $(2.8 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ wesentlich kleiner als bei Phillips und Nicholson. Es gibt jedoch einige Unterschiede in der Meßmethode, die zumindest teilweise diese Abweichung erklären können:

a. Die maximale Meßzeit bei Nicholson und Phillips betrug 100 Sekunden. In meinen Experimenten erstreckte sich die Messung über ca. 90 Minuten. Wie früher beschrieben, nimmt D mit der Zeit scheinbar ab, wenn ein Teil der Ionen nach intrazellulär gelangt. Dies ist beim TMA^+ der Fall (siehe 4.2.1.).

b. Die Applikation der Iontophorese-Pulse geschah in Tiefen bis maximal $600 \mu\text{m}$. Dagegen wurde in den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen bis in eine Tiefe von $1600 \mu\text{m}$ TMA^+ -Profile aufgenommen. Es ist denkbar, daß die Mikrostruktur des Kleinhirns und damit die Tortuosität in der Tiefe anders ist als nahe der Oberfläche.

c. Der Abstand zwischen Iontophorese-Elektrode und TMA^+ -sensitiver Elektrode bei Nicholson und Phillips betrug zwischen $40 \mu\text{m}$ und $135 \mu\text{m}$. Die "Diffusionsstrecke" war deshalb wesentlich

kleiner als die $1600\mu\text{m}$ in dieser Arbeit.

d. Die Gültigkeit der Gleichung (32), nach der in dieser Arbeit und von Nicholson/Phillips die Uptake-Konstante k ermittelt wurde, ist beim TMA^+ sehr fraglich. Nicholson und Phillips erhielten ihr Resultat nach einer halben Stunde. In meinen Versuchen ergab sich, daß sich auch nach einer halben Stunde die TMA^+ -Konzentrationen in der Tiefe noch änderten. Deshalb ist das Ergebnis von $k=3.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bzw. $f_1=0.25 \text{ h}^{-1}$ nach einer Stunde gemessen worden. Beide Resultate sollten nur als Abschätzungen der TMA^+ -Aufnahme betrachtet werden.

Es bleibt offen, ob sich damit alle Unterschiede der Meßergebnisse erklären lassen. Der grundlegende Mechanismus, wie TMA^+ -Ionen ins Kleinhirn eindringen, scheint jedoch klar:

- Für TMA^+ -Ionen existiert eine Oberflächenbarriere
- Nach Überwindung dieser Barriere diffundieren TMA^+ -Ionen frei im Extrazellulärraum
- Ein Teil der TMA^+ -Ionen dringt in die Zellen ein, was für längere Zeiten (≥ 30 Minuten) vielleicht zu einer scheinbaren Änderung der Diffusionskonstanten führt.

5.2. Lithium

Aus Experimenten an Erythrozyten sind die folgenden Transportmechanismen für Li^+ bekannt (Zitate (7-9), (41)):

- a. Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten (Leckstrom)
- b. Na^+ - Li^+ -Austausch
- c. Aktive Aufnahme in die Zellen (vermutlich wird Li^+ für K^+ durch die Na^+ - K^+ -ATPase gepumpt)
- d. Aktiver Transport aus den Zellen? (unklar; vielleicht kompetitiv zur Na^+ -Bindungsstelle der Na^+ - K^+ -Pumpe)

Der bei weitem wichtigste Mechanismus ist dabei der Na^+ - Li^+ -Austausch (siehe Abschnitt 2.4.d). Wegen des Na^+ -Gradienten ($[\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i \sim 10$) werden dabei Li^+ -Ionen aus den Zellen in den Extrazellulärraum transportiert. Demgegenüber geschieht die Li^+ -Aufnahme mit Hilfe der Mechanismen 1 und 3 viel langsamer.

An Zellkulturen von Nervenzellen gibt es neuere Resultate über die Verteilung von Li^+ -Ionen im extra- und intrazellulären Raum. Reiser und Duhm (48) erhielten für Hybridzellen aus Gliom/Neuroblastom nach 30-60 Minuten ein Verhältnis von

$$\frac{[\text{Li}^+]_e}{[\text{Li}^+]_i} = \frac{2.0 \text{ mM}}{0.6 \text{ mM}}$$

Janka et al. (25-26) inkubierten Gliazellen und Neurone mit einer Li^+ -Lösung von 2 mM und erhielten nach 60 Minuten eine intrazelluläre Konzentration von 1.4 mM.

Bis jetzt gibt es zwei Experimente mit Li^+ -ISM, bei denen $[\text{Li}^+]_i$ bestimmt wurde. Thomas, Simon und Oehme (56) erhielten ein Verhältnis von

$$\frac{[\text{Li}^+]_e}{[\text{Li}^+]_i} = \frac{1.0 \text{ mM}}{0.3 \text{ mM}}$$

bei Schnecken-Neuronen nach 30 Minuten. Die ausführlichsten Experimente mit Li^+ -Mikroelektroden wurden von Grafe und Mitarbeitern (18) am isolierten Frosch-Rückenmark durchgeführt. Sie stellten nach Superfusion mit 5 mM LiCl nach 30 Minuten eine extrazelluläre Konzentration von 3.58 ± 0.34 mM in 400-500 μ Tiefe fest. Nach 60 Minuten war $[\text{Li}^+]_e$ auf 4.33 ± 0.47 mM angewachsen. In zwei typischen Messungen betrug das Verhältnis $[\text{Li}^+]_e / [\text{Li}^+]_i$

$$\text{bei } c_e = 5 \text{ mM nach 30 min. : } \frac{3.0 \text{ mM}}{1.6 \text{ mM}}$$

$$\text{bei } c_e = 15 \text{ mM nach 15 min. : } \frac{3.2 \text{ mM}}{2.2 \text{ mM}}$$

Wendet man die Gleichungen (6) und (29) auf diese Zahlenwerte an, erhält man folgendes Resultat:

- a. Die Diffusionskonstante für die Diffusion im Extrazellulärraum liegt mit etwa $D=2,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ etwas höher als in dieser Arbeit ($D=1,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$).
- b. Die Transferkonstante von extra- nach intrazellulär ist groß, etwa $k=2,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($f_1 \sim 2 \text{ h}^{-1}$).

Damit liegen die Werte (k, f_1) von Grafe und Mitarbeitern außerhalb der an Zellkulturen und Schnecken-Neuronen gemessenen. Eine Uptake-Konstante von $k=1,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($f_1=1 \text{ h}^{-1}$) liefert nach 30 min. ein Verhältnis von

$$\frac{[\text{Li}^+]_e}{[\text{Li}^+]_i} = \frac{1.0}{0.5}$$

Die Experimente von Keiser und Duhm (Zitat (48)) bzw. Thomas und Mitarbeitern (56) liegen mit ihren Resultaten für den Intrazellulärraum etwas darunter; die Resultate von Janka et al. (25-26) liegen etwas darüber. Dieser Wert ($f_1=1.0 \text{ h}^{-1}$) ist vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Hier liegt ungefähr die Nachweisgrenze für den Einstrom nach intrazellulär (siehe 4.2.2.). Die höheren Werte von Grafe und Mitarbeitern (18) sind vermutlich damit zu erklären, daß in ihren Experimenten das intrazelluläre Natrium nicht bestimmt wurde. Ein Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ bei Superfusion mit LiCl, der durchaus denkbar ist, würde zu einer Änderung des Signals der Li^+ -Elektrode führen und ein zu großes $[\text{Li}^+]_i$ vortäuschen. Darüberhinaus gilt die Li^+ -Eichung nur für ein bestimmtes $[\text{Na}^+]_i$. Jede Abweichung davon verfälscht die Li^+ -Werte.

Hier eine Zusammenfassung der verschiedenen Li^+ -Diffusionsmessungen:

- im Kleinhirn existiert eine Oberflächenbarriere für Li^+ -Ionen
- die Diffusionskonstante für Li^+ im Nervengewebe liegt in der Gegend von $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$
- die Aufnahme von Li^+ -Ionen in die Zellen geschieht etwa mit einer Transferkonstante von $f_1=0.7 \dots 1.0 \text{ h}^{-1}$
($k=1.0 \dots 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)

5.3. Kalium

Die Diffusion von K^+ -Ionen im Gehirn wurde von einer Reihe von Autoren untersucht. In Tabelle 13 sind die Diffusionskonstanten, Tortuositäten und Barrierenkonstanten aus diesen Arbeiten zusammen mit meinen Ergebnissen aufgeführt.

Fisher, Pedley und Prince (12) registrierten mit Hilfe von kaliumsensitiven Mikroelektroden Tiefenprofile im Cortex der Katze nach Superfusion mit 12 mM KCl. Die Messung erfolgte nach 2 Stunden. Die Ergebnisse stimmen mit den Werten in dieser Arbeit (für $t > 1.0h$) gut überein. Fisher et al. deuteten ihre Messungen als freie Diffusion des K^+ im Extrazellulärraum. Sie stellten jedoch auch fest, daß D in Abhängigkeit von der Zeit immer kleiner wird.

Pape und Katzman (42-43) massen die Aufnahme von radioaktivem ^{42}K im Gehirn nach ventrikulo-cisternaler oder subarachnoidaler Perfusion. Aus der Tiefenverteilung des ^{42}K wurde der Diffusionskoeffizient bestimmt. Dabei wurde folgendes festgestellt: die Diffusion ist sehr viel langsamer als in wäßriger Lösung; D nimmt zudem mit der Superfusionszeit ab. Für $t=0.25h$, $1h$ bzw. $4h$ wurden $D=9.4$, 4.7 bzw. $2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ gemessen. Pape und Katzman erklärten ihre Experimente mit Hilfe des Drei-Kompartiment-Modells: Aufnahme des K^+ in die Zellen und in die Blutkapillaren nach Überwindung der Pia-Glia-Oberflächenbarriere. Als Transferate in den intrazellulären Raum wurden Werte zwischen $f_1=1.9 \text{ h}^{-1}$ ($k=2.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und $f_1=2.85 \text{ h}^{-1}$ ($k=4.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) angegeben. Die Variation der Diffusionskonstanten stimmt qualitativ gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Die absoluten Werte von Pape und Katzman sind aber größer als bei allen anderen Autoren. Möglicherweise hängt dies mit dem anderen Präparat oder der anderen Meßmethode zusammen.

Lux und Neher (30) applizierten Iontophoresepulse von 50 Sekunden Dauer im Cortex der Katze (Tiefe 0.5 bis 1.0 mm). Ihre Ergebnisse entsprechen den Diffusionskonstanten für kurze Meßzeiten. Lux und Neher deuteten ihre Resultate als freie Diffusion der K^+ -Ionen. Dabei ließen sie jedoch die Volumenfraktion α außer acht (Zitat (36)).

D_{KH} $t < 0.5h$ ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)	D_{KH} $t > 1.0h$ ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)	λ (relativ zu H_2O)	h (mm^{-1})	Zitat
-	2.86 ± 0.45	-	0.8 ± 0.2	Fisher et al. (12)
9.4	4.7	-	0.5	Fape et al. (43)
3.85	-	2.45	-	Lux et al. (30)
5.3	-	1.9 ± 0.2	-	Nicholson et al. (37)
-	-	2.35	-	Somjen et al. (53)
4.1 ± 0.5	2.8 ± 0.4	$2.16/2.62$	0.9 ± 0.4	diese Arbeit
6.5 ± 0.3	5.3 ± 0.5	$1.72/1.90$	-	diese Arbeit, mit $10^{-5}M$ Ouabain

Tabelle 12. Diffusionskonstanten, Tortuosität und Barrierekonstanten für Kalium aus verschiedenen Experimenten

Nicholson, Phillips und Gardner-Medwin (37) stellten bei der Applikation von Iontophorese-Pulsen im Ratten-Kleinhirn fest, daß die für K^+ gemessene Volumenfraktion mit $\alpha=1.71$ bis 3.65 nicht mit einer freien Diffusion vereinbar war. In einem weiteren Experiment von Gardner-Medwin und Nicholson (14-15) wurde ein elektrischer Gleichstrom durch Gehirngewebe der Ratte geschickt. Der Anteil des Stromes, der von K^+ -Ionen getragen wurde (d.h. die Transportzahl für K^+) war mit 5-8 % etwa 5x größer als der theoretisch berechnete Anteil, der sich aus der extrazellulären K^+ -Konzentration ergibt. Daraus folgerten Nicholson und Gardner-Medwin, daß etwa 80 % des K^+ -Transports durch den Intrazellulärraum erfolgt. Sie stellten dafür ein Modell auf, das auf dem zum erstenmal von Orkand et al. (40) vorgeschlagenen "spatial buffering" beruht. Danach sorgt ein elektrisch gekoppeltes System von Gliazellen (ein Synzytium) mit einer elektrischen Ausbreitungskonstante l von 0.2 bis 0.4 mm für den experimentell beobachteten raschen Abtransport erhöhter K^+ -Konzentrationen. (siehe Abschnitt 2.6.). Dieses "spatial buffering" ist über große Distanzen (~ 1 mm) etwa 5x effektiver als die K^+ -Diffusion (15-16). Zusätzlich folgt aus dem Modell, daß an Stellen hoher K^+ -Konzentration der Extrazellulärraum schrumpft (Zitat (5)).

Die theoretische Diskussion der "räumlichen Pufferung" in Abschnitt 2.6. hat schon gezeigt, daß das in dieser Arbeit verwendete Drei-Kompartiment-Modell nicht ausreicht, um den K^+ -Transport im Gehirn zu beschreiben. Die experimentellen Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.2.3.) bestätigen diese Aussage. Auch für kurze Superfusionszeiten ($< 0.5h$) ergibt sich keine einheitliche Diffusionskonstante für die verschiedenen Tiefen im Kleinhirn. Die K^+ -Konzentration ist in der Tiefe (~ 1 mm) immer höher, als sie sein müsste, wenn nur die freie Diffusion und die lokale Aufnahme in die Zellen eine Rolle spielten. Mit viel Vorsicht läßt sich daraus ein Hinweis auf einen Transportmechanismus sehen, der ähnlich wie der "spatial buffer" arbeitet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch von ihrem Ansatz her nicht geeignet, den offenbar komplizierten Mechanismus des K^+ -Transports über größere Entfernungen aufzuklären.

Die Ouabain-Experimente (siehe 4.2.4.) sollten einen Anhaltspunkt dafür geben, wie wichtig die aktive Aufnahme in die Zellen für den Abtransport erhöhter K^+ -Konzentrationen ist. Bis jetzt sind keine Diffusionsmessungen nach Applikation eines Pumpenblockers bekannt. Krnjevic und Morris (28-29) maßen das Zeitverhalten eines reizinduzierten K^+ -Anstiegs im Nucleus cuneatus der Katze unter 10^{-4} M K-Strophanthidin. Sie stellten fest, daß die Zeitkonstante für den K^+ -Abtransport (d.h. für den Abfall des K^+ -peaks) etwa doppelt so groß war wie unter Kontrollbedingungen. Die Erhöhung der Diffusionskonstanten in dieser Arbeit nach 10^{-5} M Ouabain steht damit in Einklang, denn eine Blockade der Aufnahme in die Zellen führt zu einer höheren K^+ -Konzentration und zu einer rascheren Diffusion im Extrazellulärraum. D ist aber immer noch zeitabhängig. Als Ursache für diese Beobachtungen kann man diskutieren:

- der passive Einstrom in die Zellen wird durch Ouabain nicht gestört
- die Pumpe ist mit 10^{-5} M Ouabain nur partiell blockiert (siehe Zitat (58))
- die Ouabain-Konzentration ist abhängig vom Ort und von der Zeit (Diffusion des Ouabain im Kleinhirn)
- es ist unbekannt, wie Ouabain auf den "spatial buffer"-Mechanismus wirkt

Die Ergebnisse der K^+ -Messungen in dieser Arbeit kann man unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Phänomene so zusammenfassen:

- es existiert eine Oberflächenbarriere für K^+ -Ionen
- K^+ -Ionen diffundieren nicht nur frei im Extrazellulärraum. Die Diffusionskonstante hängt von der Zeitdauer der Superfusion und der Tiefe ab.
- es existiert möglicherweise neben der Aufnahme in die Zellen ein weiterer Mechanismus, mit dessen Hilfe erhöhte K^+ -Konzentrationen vom Nervengewebe verarbeitet werden.
- die aktive Aufnahme von K^+ -Ionen in die Zellen (Neurone oder Gliazellen) liefert einen signifikanten Beitrag zum K^+ -Transport.

5.4. Die Aussagekraft der Diffusionsmessungen

Die freie Diffusion in einem halb-unendlichen Medium stellt ein relativ einfaches physikalisches Problem dar. Es schien deshalb den Versuch wert, den Transport von Ionen im extrazellulären Raum des Nervengewebes mit Hilfe von Diffusionsmessungen zu untersuchen. Die Agar-Experimente erbrachten dann auch eindeutige Ergebnisse, die leicht zu interpretieren waren und nicht im Widerspruch zu den vorhandenen Literaturwerten standen. Im Kleinhirn jedoch wird die freie Diffusion der Ionen auf vielfache Art "gestört": eine Oberflächenbarriere verhindert den Eintritt der Ionen in das Nervengewebe; die Tortuosität des Mediums reduziert die Diffusionskonstante; Ionen derselben Sorte können zwischen dem intra- und dem extrazellulären Raum und den Blutkapillaren ausgetauscht werden, wobei der Transport entlang eines elektrochemischen Gradienten (passiv) erfolgen kann, wie auch mit Hilfe eines aktiven Transportsystems; Ionen können auch gegen Ionen einer anderen Sorte über die Zellmembranen hinweg ausgetauscht werden; schließlich können über größere Strecken hinweg elektrisch gekoppelte Zellen Konzentrationsunterschiede ausgleichen ("spatial buffering"). Vermutlich existieren noch weitere Transportmechanismen für Ionen im Kleinhirn der Ratte, die bis jetzt noch nicht oder zu wenig bekannt sind.

Die meisten der hier aufgeführten "Störungen" der freien Diffusion lassen sich im Prinzip theoretisch behandeln und in die Theorie der Diffusion einfügen (siehe die ausführliche Behandlung dazu in Abschnitt 2.4.). Da die Meßmethodik dabei jedoch dieselbe bleibt, werden die Ergebnisse immer schwieriger zu interpretieren. Der Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren (und auch der Vergleich deren Resultate untereinander) stößt ebenfalls auf Hindernisse. Denn sowohl Zeitpunkt (t) und Ort der Messung (x) als auch Konzentration (c_e) und Applikationsart des untersuchten Ions (Superfusion, Perfusion, Iontophorese) können unterschiedliche Meßergebnisse hervorrufen.

Mit Einschränkungen kann man all die Messungen für aussagekräftig halten,

- bei denen durch Wahl der Meßbedingungen die Störungen so klein wie möglich gehalten wurden, wie z.B. bei der Iontophorese ($t < 1$ min., $x < 200\mu$).
- bei denen die Störungen der freien Diffusion auch für längere Zeiten und größere Abstände noch klein sind, wie z.B. beim Li^+ -Ion und beim TMA^+ -Ion.

Beim Kalium dagegen sind die Transportmechanismen so kompliziert, daß die Diffusionsmessungen nur mehr unscharfe Aussagen liefern. Es ist zwar offensichtlich, daß die freie Diffusion das Verhalten der K^+ -Ionen nicht mehr beschreiben kann. Viel mehr Informationen kann das hier beschriebene, relativ einfache Diffusionsexperiment nicht liefern. Einen experimentellen Ansatz, der beim K^+ mehr Erfolg verspricht, haben Gardner-Medwin und Nicholson (14)(17) sowie Dietzel und Mitarbeiter (5) mit der Bestimmung der Transportzahl beschrieben.

Fazit der in dieser Arbeit durch geführten Messungen: die Bestimmung der Diffusionskonstanten funktioniert nur in relativ einfachen Fällen.

6. Zusammenfassung

1. Es wurden die experimentellen und theoretischen Grundlagen für die Messung der Diffusionskonstanten bestimmter Ionen (K^+ , Li^+ , TMA^+) im Gehirngewebe geschaffen.
2. Dazu wurde ein Eichverfahren für ionenselektive Mikroelektroden entwickelt, um diese Ionen im Extrazellulärraum exakt messen zu können.
3. Die Diffusionskonstanten im Kleinhirn der Ratte sind wegen der Tortuosität deutlich kleiner als im Agar oder in wäßriger Lösung.
4. Die inneren Hirnhäute (Pia, Arachnoidea) stellen bei allen untersuchten Ionen eine Diffusionsbarriere dar.
5. Li^+ - und TMA^+ -Ionen diffundieren in erster Näherung frei im Extrazellulärraum und werden nur vergleichsweise langsam von den Zellen aufgenommen.
6. Für das K^+ -Ion gilt die freie Diffusion nicht mehr, denn die Diffusionskonstante ist vom Ort und von der Zeit abhängig.
7. Ein Teil der K^+ -Ionen wird aktiv von den Zellen aufgenommen, was durch Ouabain hemmbar ist.
8. Es wird diskutiert, welche Rolle der "spatial buffer"-Mechanismus beim K^+ -Transport bzw. bei der K^+ -Clearance spielt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. M.W.B. Bradbury und B.Stulcova
Efflux mechanism contributing to the stability of the
potassium concentration in cerebrospinal fluid
J.Physiol. 208, 415(1970).
2. W.J. Cody
Rational Chebyshev approximation for the error function
Mathem. of Computation 22, 144(1968).
3. G.E. Cordingley und G.G. Somjen
The clearing of excess potassium from extracellular space
in spinal cord and cerebral cortex
Brain Res. 151, 291(1978).
4. J. Crank
The mathematics of diffusion
Clarendon Press, Oxford, 1964.
5. I. Dietzel, U. Heinemann, G. Hofmeier und H.D. Lux
Transient changes in the size of the extracellular space
in the sensimotor cortex of cats in relation to stimulus-
induced changes in potassium concentration
Exp. Brain Res. 40, 432(1980).
6. D.Dobos
Electrochemical Data
Elsevier, Amsterdam, 1975.
7. J. Duhm und B.F. Becker
Studies on lithium transport across the red cell membrane.
V. On the nature of the Na^+ -dependent Li^+ -countertransport
system of mammalian erythrocytes
J.Membrane Biol. 51, 263(1979).

8. J. Duhm, F. Eisenried, B.F. Becker und W.Greil
Studies on lithium transport across the red cell membrane.
I. Li^+ uphill transport by the Na^+ -dependent Li^+ -counter-
transport system in human erythrocytes
Pflügers Archiv 364, 147(1976).
9. D.L. Dunner, H.L. Meltzer und R.R. Fieve
Clinical correlates of the lithium pump
Am. J.Psychiatry 135, 1062(1978).
10. G. Eisenman (Ed.)
Glass electrodes for hydrogen and other cations
Marcel Dekker, New York, 1967.
11. J.D. Fenstermacher, C.S. Patlak und R.G. Blasberg
Transport of material between brain extracellular fluid,
brain cells and blood
Fed.Proceedings 33, 2070(1974).
12. R.S. Fisher, T.A. Pedley und D.A. Prince
Kinetics of potassium movement in normal cortex
Brain Res. 101, 223(1976).
13. R. FitzHugh
Impulses and physiological states in theoretical models
of nerve membrane
Biophysical J. 1, 445(1961).
14. A.R. Gardner-Medwin
The migration of potassium produced by electric current
through brain tissue
J.Physiol. 269, 32P(1977).
15. A.R. Gardner-Medwin
The role of cells in the dispersal of brain extracellular
potassium
in: "Ion-selective microelectrodes and their use in excitable
tissues", E.Sykova et al. (Eds.), Plenum Press, New York, 1980.

16. A.R. Gardner-Medwin, J.L. Gibson und D.J. Willshaw
The mechanism of potassium dispersal in brain tissue
J.Physiol. 293, 37P(1979).
17. A.R. Gardner-Medwin und C. Nicholson
Measurements of extracellular potassium and calcium
concentration during passage of current across the surface
of the brain
J.Physiol. 275, 66P(1978).
18. P. Grafe, J. Rimpel, M.M. Reddy und G. ten Bruggencate
Lithium distribution across the membrane of motoneurons
in the isolated frog spinal cord
Pflügers Archiv 393, 297(1982).
19. "Handbook of Chemistry and Physics", 50th Edition, Chemical
Rubber Publishing Co., Cleveland (Ohio), 1975.
20. A.J. Hansen, H. Lund-Andersen und C. Crone
 K^+ -permeability of the blood-brain barrier, investigated by
aid of a K^+ -sensitive microelectrode
Acta physiol. scand. 101, 438(1977).
21. A.J. Hansen und C.E. Olsen
Brain extracellular space during spreading depression and
ischemia
Acta physiol. scand. 108, 355(1980).
22. S.P. Hastings
Some mathematical problems from neurobiology
Am. Math. Monthly 82, 881(1975).
23. P. Henderson
Z.Phys.Chem. 59, 118(1907); Z.Phys.Chem. 63, 325(1908).

24. H.G.Hertz, B. Lindman und V. Siepe
Translational motion and hydration of the symmetrical
tetraalkylammonium ions in aqueous solution
Ber. Dt. Bunsenges. Physikal. Chemie 73, 542(1969).
25. Z. Janka, I.Szentistvanyi, A. Juhasz und A. Rimanoczy
Difference in lithium transport between neurones and glia
in primary culture
Neuropharmacology 19, 827(1980).
26. Z. Janka, I. Szentistvanyi, A.Juhasz und A. Rimanoczy
The influence of external sodium and potassium on lithium
uptake by primary brain cell cultures at 'therapeutic'
lithium concentration
Psychopharmacology 71, 159(1980).
27. R. Katzmann und R. Grossman
Neuronal activity and potassium movement
in: "Brain Work", D.H. Ingvar, N.A. Lassen (Eds.),
Munksgaard, Kopenhagen, 1975, pp. 149-166.
28. K. Krnjević und M.E. Morris
Factors determining the decay of K^+ -potentials and focal
potentials in the central nervous system
Can. J. Physiol. Pharmacol. 53, 923 (1975).
29. K. Krnjević und M.E. Morris
Strophanthidin effects on extracellular K^+ and electrogenic
pumping in the cuneate nucleus
J. Physiol. 250, 36P(1975).
30. H.D. Lux und E. Neher
The equilibrium time course of $(K^+)_{\circ}$ in cat cortex
Exp. Brain Res. 17, 190(1973).
31. G.J. Moody und J.D.R. Thomas
Selective ion-sensitive electrodes
Marrow Publishing Co., Watford(Engl.), 1971.

32. W.E. Morf und W. Simon
Ion-selective electrodes based on neutral carriers
in: "Ion-selective electrodes in Analytical Chemistry",
H. Freiser (Ed.), Vol.1, Plenum Press, New York, 1978.
33. J. Nagumo, S. Arimoto und S. Yoshizawa
An active pulse transmission line simulating nerve axon
Proc. IRE 50, 2061(1962).
34. C. Nicholson
Brain-cell microenvironment as a communication channel
in: "The Neurosciences: 4th Study Program", F.G. Worden (Ed.),
MIT Press, Cambridge(Mass.), 1979, pp.457-476.
35. C. Nicholson
Dynamics of the brain cell microenvironment
Neurosciences Res. Prog. Bull. 18, 181(1980).
36. C. Nicholson und J.M. Phillips
Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction
in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum
J. Physiol. 321, 225(1981).
37. C. Nicholson, J.M. Phillips und A.R. Gardner-Medwin
Diffusion from an iontophoretic point source in the brain.
Role of tortuosity and volume fraction
Brain Res. 169, 580(1979).
38. B.P. Nikolsky
Zh. Fiz. Khim. 10, 495(1937).
39. M. Oehme
Beitrag zur Entwicklung ionenselektiver Mini- und Mikroelek-
troden und zu deren Messtechnik
Dissertation, ETH Zürich, 1977.

40. R.K. Orkand, J.G. Nicholls und S.W. Kuffler
Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia
J. Neurophysiol. 29, 788 (1966).

41. G.N. Pandey, B. Sarkadi, M. Haas, R.B. Gunn, J.M. Davis und D.C. Tosteson
Lithium transport pathways in human red blood cells
J. Gen. Physiol. 72, 233(1978).

42. L.G. Pape und R. Katzman
Response of glia in cat sensimotor cortex to increased extracellular potassium
Brain Res. 38, 71(1972).

43. L.G. Pape und R. Katzman
 K^{42} distribution in brain during simultaneous ventriculo-cisternal and subarachnoid perfusion
Brain Res. 38, 49(1972).

44. T.A. Pedley, R.S. Fisher und D.A.Prince
Focal gliosis and potassium movement in mammalian cortex
Exp. Neurology 50, 346(1976).

45. M. Planck
Ann. Phys. 39, 161(1890); Ann. Phys. 40, 56(1890).

46. E. Fretsch, D. Ammann und W. Simon
Design of ion carriers and their application in ion-selective electrodes
Res. Develop. 25, 20(1974).

47. D.A. Prince, H.D. Lux und E. Neher
Measurement of extracellular potassium activity in cat cortex
Brain Res. 50, 489(1973).

48. G. Reiser und J. Duhm
Transport pathways for lithium ions in neuroblastomaxglioma
hybrid cells at 'therapeutic' concentrations of Li^+
Brain Res. 252, 247(1982).

49. B. Sarkadi, J.K. Alifimoff, R.B. Gunn und D.C. Tosteson
Kinetics and stoichiometry of Na^+ -dependent Li^+ -transport
in human red blood cells
J. Gen. Physiol. 72, 249(1978).

50. A. Schwartz, G.E. Lindenmayer und J.C. Allen
The Na^+ - K^+ -ATPase: Pharmacological, physiological and
biochemical aspects
Pharmacol. Reviews 27, 3(1975).

51. J. Skou
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across
cell membrane
Physiol. Review 45, 586(1965).

52. G.G. Somjen
Electrophysiology of neuroglia
Ann. Review Physiology 37, 163 (1975).

53. G.G. Somjen und M. Trachtenberg
Neuroglia as generator of extracellular current
in: "Origin of cerebral field potentials", Speckman,
Caspers (Eds.), Thieme, Stuttgart, 1979.

54. R.A. Steiner, M. Oehme, D. Ammann und W. Simon
Neutral carrier Na^+ -selective microelectrode for intra-
cellular studies
Anal. Chemistry 51, 351(1979).

55. A.J. Strecok
On the calculation of the inverse of the error function
Mathem. of Computation 22, 144(1968).

56. R.C. Thomas, W. Simon und M. Oehme
Lithium accumulation by snail neurones measured by a new
 Li^+ -sensitive microelectrode
Nature 258, 754(1975).
57. A. Ullrich, P. Baierl und G. ten Bruggencate
Extracellular potassium in rat cerebellar cortex during
acute and chronic lithium application
Brain Res. 192, 287 (1980).
58. A. Ullrich, R. Steinberg, P. Baierl und G. ten Bruggencate
Changes in extracellular potassium and calcium in rat
cerebellar cortex related to local inhibition of the sodium
pump
Pflügers Archiv 395, 108(1982).
59. B.A. Vern, W.H. Schuette und L.E. Thibault
(K^+)_o-clearance in cortex: a new analytical model
J. Neurophysiology 40, 1015(1977).
60. J.L. Walker
Anal. Chemistry 43, 89A(1971).

Herrn Prof. ten Bruggencate danke ich für die Anregung zur vorliegenden Arbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Für kritische und hilfreiche Diskussionen gilt mein Dank A. Ullrich, P. Grafe, P. Saggau und M. Galvan.

C. Müller und M.M. Reddy danke ich für den Bau der ionenselektiven Elektroden und die Mithilfe bei den Experimenten.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts bedanken, die mich in irgendeiner Weise unterstützt haben.

Am 22. Juni 1950 wurde ich als Sohn des Richters Josef Baierl und seiner Frau Margarete in Landshut geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die St.Nikola-Volksschule in Landshut. Im Herbst 1960 trat ich in das Hans-Carossa-Gymnasium am gleichen Ort ein. Im Juni 1969 schloß ich meine Schulausbildung mit dem Abitur ab.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im Februar 1975 mit der Diplomhauptprüfung abschloß. Meine Diplomarbeit führte ich am Lehrstuhl Prof. J.Brandmüller durch. Im Mai 1978 promovierte ich an der Universität München zum Dr.rer.nat. Das Thema meiner Dissertation lautete: "Kontinuums-Resonanz-Ramanstreuung an Brom".

Im Wintersemester 1975/76 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im Mai 1982 mit der Approbation als Arzt abschloß. Von 1978 bis 1981 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut in München bei Prof. G.ten Bruggencate.

Seit August 1982 bin ich an der Radiologischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern beschäftigt.

